Untersuchungen zum Redoxstatus des Glutathionsystems in der Langerhansschen Insel der Ratte

Einfluß von Perinatalzeit, exogenem Insulin und Leucin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Lutz
aus Öhringen

1981

81 283

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548903_0012

Untersuchungen zum Redoxstatus des Glutathionsystems in der Langerhansschen Insel der Ratte

Einfluß von Perinatalzeit, exogenem Insulin und Leucin

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Lutz
aus Öhringen

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1981

Dekan: Prof. Dr. E. Reinhard

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1978 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im April 1981 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
c-AMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
F-1,6-PP	Fructose-1,6-biphosphat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
G-6-P	Glucose-6-phosphat
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB	Krebs-Ringer-Bicarbonat
mE	Millieinheiten
µE	Mikroeinheiten
mM	millimolar
µM	mikromolar
min	Minuten
MPA	Metaphosphorsäure
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
NEM	N-Ethylmaleimid
n.s.	nicht signifikant
OPT	Orthophthaldialdehyd
P	Probability
pCMB	para-Chloromercuribenzoat
pmol	Picomol
6-PG	6-Phosphogluconat
PPS	Pentosephosphatshunt
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard error of the mean

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.2.	Fragestellung	11
2.	Material	14
2.1.	Versuchstiere	14
2.2.	Geräte	16
2.3.	Chemikalien und Enzyme	17
2.4.	Nähr- und Reagenzlösungen	18
2.4.1.	Hanks' Lösung	18
2.4.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	18
2.4.3.	Puffer für Ratteninsulinlösung	19
2.4.4.	Phosphatpuffer für Glutathionbestimmung	20
3.	Methoden	21
3.1.	Isolierung der Langerhansschen Inseln bei erwachsenen Ratten	21
3.1.1.	Operation	21
3.1.2.	Isolierung der Langerhansschen Inseln	21
3.2.	Isolierung der Langerhansschen Inseln bei neugeborenen und foetalen Ratten	23
3.2.1.	Schnittentbindung	23
3.2.2.	Isolierung der Langerhansschen Inseln bei neugeborenen und foetalen Ratten	23
3.3.	Vorinkubation der Inseln	24
3.4.	Hauptinkubation	25
3.5.	Bestimmung von Glutathion	25
3.5.1.	Bestimmung von GSH	27
3.5.2.	Bestimmung von GSSG	27
3.5.3.	Versuchsauswertung	28

		Seite
3.6.	Einfluß der Reaktionszeit auf die Fluoreszenz	29
3.7.	Insulinbestimmung	30
4.	Versuchsergebnisse	32
4.1.	Einfluß von Glucose auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	32
4.2.	Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose	42
4.3.1.	Einfluß von Leucin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose	51
4.3.2.	Einfluß von Leucin auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte	58
4.4.	Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose und Leucin	61
4.5.	Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, 5 Tage alten Neugeborenen und Foeten	69
5.	Diskussion	80
5.1.	Einfluß der Inkubationszeit	80
5.2.	Glucose und exogenes Insulin	85
5.3.1.	Leucin	94
5.3.2.	Leucin und exogenes Insulin	100

Seite

5.4. Foeten, Neugeborene, Erwachsene 101

6. Zusammenfassung 112

6.1. Zielsetzung 112

6.2. Ergebnisse 113

6.3. Schlußfolgerungen 114

7. Literaturverzeichnis 116

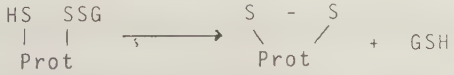
---

1. EINLEITUNG

1.1. Stand der Forschung

Glutathion ist die wichtigste Thiolverbindung in lebenden Zellen und im extrazellulären Milieu von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen weit verbreitet. Es wurde von Frederick Gowland Hopkins 1921 isoliert (1). Glutathion stellt ein Tripeptid der Zusammensetzung L-γ-Glutamyl-L-Cysteinyl-L-Glycin dar. Seine Funktion innerhalb des Redoxsystems ist von Bedeutung.

In der Zelle liegen reduziertes und oxidiertes Glutathion, gemischte Disulfide und Thiolester des Glutathions vor. Den Hauptanteil stellt normalerweise die reduzierte Form dar mit Konzentrationen von 0,1 - 10 mM (2), während oxidiertes Glutathion in viel geringeren Mengen zu finden ist, etwa 4 - 50 μM (3). Gemischte Disulfide, die etwa 1 $\leq$ 50 % des Gesamtglutathiongehaltes der Zelle ausmachen und Thiolester werden als Reservepool für GSH angesehen (4).
Bei Untersuchungen an Erythrocyten fanden Kosower und Kosower (5) einen "hidden pool": Desoxyhämoglobinhaltige Zellen wiesen mehr GSH auf als Zellen, die Oxyhämoglobin enthielten. Möglicherweise rührt dies von einer Konformationsänderung der Proteinstruktur nach Sauerstoffabgabe her:



Andere Autoren weisen ebenfalls auf die Existenz verschiedener GSH-Pools hin (6, 7).

Glutathion hat für die Funktion der Zelle große Bedeutung. So führt die Oxidation von GSH zur Abnahme der Aktivität der Na/K-Pumpe und zur Zunahme der Permeabilität für Kationen (8). Eine Änderung der Anzahl der Thiolgruppen in der Mitochondrienmembran durch thioloxidierende Reagentien bewirkt eine veränderte Membranaktivität (9, 10). Der Hexosetransport der Fettzelle ist von einer Disulfidbildung in der Membran abhängig, die durch Insulin und bestimmte Oxidantien hervorgerufen werden kann (11).
Auch beim Transport von Aminosäuren spielt Glutathion eine Rolle. Im γ-Glutamylzyklus werden Aminosäuren mit Hilfe der membranständigen γ-Glutamyltranspeptidase, deren Aktivität an den Stellen besonders hoch ist, an denen ein verstärkter Membrantransport vorliegt, über eine Translokationsreaktion in die Zelle aufgenommen (12). Durch das Thiolreagenz Diamid kann die Aufnahme von Aminosäuren gehemmt werden (13).

Die Aktivität zahlreicher Enzyme wird durch SH-Gruppen beeinflußt (14-17). Vermutlich spielt die Konformationsänderung eine Rolle, die durch Thiol-Disulfid-Übergang zustande kommt und die Aktivierung des Enzyms bewirkt (3).

In mit Diamid behandelten Retikulozyten wurde eine Hemmung der Proteinsynthese festgestellt (18). GSH war sowohl zur

Tabelle 1

Funktionen von Glutathion in der Zelle (s. Text)

- Erhaltung der Strukturintegrität
  Regulation des Thiol/Disulfid-Verhältnisses von Proteinen Schutz der Lipide gegen Peroxidation durch
  a) Abfangen freier Radikale
  b) Zerstörung von Lipidhydroperoxiden
- Funktionelle Prozesse von Membranen
  Ionen-, Aminosäuren- und Zuckertransport
  Neurotransmitterfreisetzung
- Mikrotubuläres System
  (De-) Polymerisation von Tubulin
  Phagocytose
- Konformation von Proteinen und Modulation der Enzymaktivität
  (Des-) Aktivierung von Proteinen
  Bildung einer stabilen Konformation durch Thiol-Disulfid-Austausch
- Synthese von Makromolekülen
  Initiation
  Elongation
- Metabolismus elektrophiler Agentien
- Neurotransmitterfreisetzung
- Modulation der Sensorik

Initiation als auch zur Elongation von Peptidketten nötig.

Eine wesentliche Funktion hat Glutathion auch bei Entgiftungsreaktionen der Zelle. Epoxide werden mit GSH in nicht toxische Derivate umgewandelt (19). Die Reaktion elektrophiler Stoffe mit GSH führt unter Einfluß der GSH-S-Transferasen zu GSH-Konjugaten, die entweder ausgeschieden oder zur Mercaptursäure metabolisiert werden (20). Radikale werden von Glutathion direkt abgefangen (21).
Schließlich soll die Beziehung zwischen Glutathion und der Neurotransmitterfreisetzung erwähnt werden. Werman et al. (22) beobachteten bei neurophysiologischen Untersuchungen am Frosch nach Behandlung mit Diamid eine Zunahme des Endplattenpotentials. Als Mechanismus wird eine Disulfidbildung in der Membran angenommen, die zur Membrankontraktion und somit zur Freisetzung von Neurotransmittern führt (23, 24). Zusammenhänge zwischen Glutathion und Insulinsekretion werden an anderer Stelle erläutert (vgl. S. 8); zunächst soll auf die in der Literatur beschriebenen Theorien, die zur Insulinsekretion führen, eingegangen werden.

Noch ist nicht klar, auf welche Weise Glucose, der physiologisch bedeutendste Stimulator, die Insulinsekretion auslöst. Folgende Theorien stehen dabei zur Diskussion:
1. Das Glucosemolekül reagiert mit einem hypothetischen Rezeptor an der Membran der ß-Zelle und führt dadurch zur Sekretion (25). Für diese Theorie spricht, daß nach Zufuhr von Glucose die Insulinsekretion sofort einsetzt, die Meta-

boliten G-6-P, 6-PG,F-1,6-PP und 3-Phosphoglycerat der Insulinsekretion aber zeitlich nachhängen (25). Auch Galactose, Fructose, Mannose und die Alkohole Xylitol und Sorbitol stimulieren die Sekretion. Der Gehalt an G-6-P steigt dabei nicht an (25).

Des weiteren ist eine Insulinsekretion zu sehen, wenn mit Jodacetat die Glycolyse blockiert wird, mit Pyruvat aber für die Energieversorgung der ß-Zelle gesorgt ist (26).

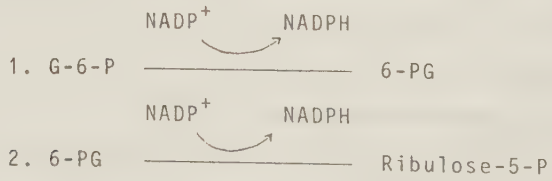
Für die Rezeptortheorie spricht auch die Tatsache, daß Glucose die Insulinfreisetzung dosisabhängig stimuliert (27, 28) und vorwiegend das α-Anomer der D-Glucose zur Sekretion führt (29, 30).

2. In der ß-Zelle wird Glucose über die Glycolyse und über den Pentosephosphatshunt (PPS) abgebaut (31 - 34), wobei die Glycolyse im Vergleich zum PPS in den meisten Geweben den Hauptanteil ausmacht (35).

Da die Konzentration einiger Metaboliten des Glucoseabbaus mit der durch Glucose induzierten Insulinsekretion korreliert (32, 36-40), eine Insulinsekretion aber nicht stattfindet, wenn die Glycolyse durch 2-Desoxyglucose (41 - 43) blockiert wird, zeigt, daß der Glucosemetabolismus über die Glycolyse für die Insulinfreisetzung nötig ist. Jodacetat, das die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, also die Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat, hemmt, führt ebenfalls zur Hemmung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Selbst nach Zusatz von Pyruvat, das die durch Jodacetat gestörte Energieversorgung der ß-Zelle durch ATP-Produktion wieder herstellt, die Insulinsekretion aber nicht beeinflußt, wird eine Hemmung beobachtet (45 - 47). Sussman et al. ver-

muten deshalb, daß der von der Glucosekonzentration abhängige Metabolit 1,3-Diphosphoglycerat als Signal für die Insulinsekretion in Frage kommt (48). Kohlenhydrate, bei deren Abbau über Glycolyse oder PPS die gleichen Metaboliten entstehen wie beim Abbau der Glucose, stimulieren die Insulinsekretion (27, 36).
Die Insulinsekretion kann auch dann stimuliert werden, wenn extrazellulär keine Glucose vorhanden ist und Glycogenolyse und Glycolyse aktiviert werden (49).

Möglicherweise spielt auch der PPS für die Insulinsekretion eine Rolle. Darauf deuten mehrere Fakten hin.
- So berichten Heinze und Steinke (50), daß bei Inseln foetaler Ratten auf einen Glucosereiz hin keine Insulinfreisetzung festzustellen ist. Diese foetalen Inseln bauen Glucose über die Glycolyse, nicht über den PPS ab. Erst etwa zwei Tage nach der Geburt setzt ein Abbau über den PPS und damit auch die Insulinsekretion ein.
- Es ist bekannt, daß über den PPS an zwei Stellen NADPH gebildet wird



Dieses NADPH dürfte für den Sekretionsmechanismus von Insulin eine Rolle spielen, was durch Hemmung des PPS durch 6-Aminonicotinamid, einem Antimetaboliten der NAD- bzw. NADP-Synthese (51, 52), gezeigt werden konnte (53, 54).

- Eine verminderte Aktivität des PPS durch Chlorpromazin geht ebenfalls mit einer Hemmung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion einher (55).
- Ribosen stimulieren die Insulinsekretion. Sie werden aber nicht über die Glycolyse, sondern über den PPS abgebaut (56).
- Die PPS-Aktivität korreliert mit der Glucosekonzentration und der durch Glucose induzierten Insulinsekretion, was durch Bestimmung des ^{14}C-1-Glucose/^{14}C-6-Glucose-Quotienten gemessen wurde (57).
- Die Bedeutung von NADPH für die Insulinsekretion ergibt sich auch aus der Beobachtung, daß Methylenblau den durch Glucose und Glucose plus Leucin erhöhten NADPH/NADP-Quotienten (58, 59), als auch die Insulinabgabe (58, 60, 61) vermindert (aber nicht den NADH/NAD-Quotienten) (58).
- Ein weiterer Befund deutet darauf hin, daß NADPH möglicherweise für die Sekretion von Insulin eine Rolle spielt: im Hunger ist sowohl der NADPH/NADP-Quotient (62) geringer als bei normal gefütterten Tieren, wie auch die glucoseinduzierte Insulinsekretion (63 - 65).
- Auch exogenes Insulin erniedrigt den NADPH/NADP-Quotienten und die durch Glucose induzierte Insulinsekretion über einen Feedback-Mechanismus (66, 67).
- Untersuchungen in Abhängigkeit vom Alter lieferten unterschiedliche Resultate. So wurde an Mäuseinseln festgestellt, daß Glucose bei alten Tieren den NADPH-Gehalt nicht erhöhen kann und die Insulinsekretion vermindert ist (68). Spätere

Ergebnisse an Ratteninseln zeigen allerdings, daß der NADPH-Gehalt bei jungen und alten Tieren nach Glucosegabe ansteigt (69).

Alle diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme einiger Autoren, daß zwischen Insulinsekretion der Langerhansschen Insel und PPS eine Beziehung besteht (70, 71), bzw. zwischen NADPH/NADP-Quotient und Insulinsekretion (72).

Die Bedeutung des PPS dürfte in der Bereitstellung von NADPH liegen. NADPH steht mit dem Redoxzustand des Glutathions in Verbindung. Mit Hilfe von Glutathion-Reduktase kann reduziertes Glutathion gebildet werden:

$$GSSG + NADPH/H^+ \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+$$

Die folgenden Befunde sollen einen möglichen Zusammenhang zwischen Pyridinnukleotiden, Glutathion und Insulinsekretion zeigen.

- Mit steigender Glucosekonzentration wurde eine Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten (62), des GSH/GSSG-Quotienten (73) und der Insulinsekretion (74) beobachtet. Bei weiteren Untersuchungen an Pankreasinseln wurde außerdem festgestellt, daß der NADPH/NADP-Quotient im Cytosol auf Glucosegabe stärker beeinflußt wird als in Mitochondrien (75). Die Reduktion von GSSG durch Glutathion-Reduktase findet ebenfalls im Cytosol statt.
- Die Aktivität der Glutathion-Reduktase ist in Inseln höher als im exokrinen Pankreas und in der Leber (76).
- NADH spielt im Vergleich zu NADPH als Kofaktor für die

Glutathion-Reduktase eine geringere Rolle, die Enzymaktivität ist in Gegenwart von NADPH wesentlich höher (77). Dies zeigt, daß in erster Linie das über den PPS bereitgestellte NADPH zur Reduktion von GSSG verwendet wird.

Erste Anhaltspunkte, daß SH-Gruppen bei Sekretionsprozessen von Hormonen mitwirken, gaben Douglas et al. (78) und Schofield (79). Weitere Hinweise lieferten Hellman et al. (80). Ammon et al. stellten fest, daß eine Erhöhung der Glucosekonzentration mit einer Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten einhergeht (73), bzw. eine Abhängigkeit der Insulinsekretion von der Glucosekonzentration zu sehen ist (62).
Mit Hemmstoffen wie Diamid, einem Oxidans von GSH und anderen Thiolen (81 - 83), und t-BHP, das als Substrat der Glutathionperoxidase fungiert (84, 85), wurde die durch p-CMB (61), Glucose, Glucose plus Leucin (59) und Glucose plus Tolbutamid (74) induzierte Insulinsekretion gehemmt. Methylenblau, t-BHP und Diamid erniedrigten aber auch den durch Glucose erhöhten GSH-Gehalt der Langerhansschen Insel und den GSH/GSSG-Quotienten signifikant (74).

Bei alten Tieren wurde eine Abnahme der glucoseinduzierten Insulinsekretion (86) beobachtet, die mit einer Senkung des GSH/GSSG-Quotienten einherging (86). Weder Glucose, noch Glucose plus Leucin führten zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes (86). Möglicherweise ist die verminderte Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf einen Sekretionsreiz in Zusammenhang mit der

Abnahme der Glucoseoxidation über den PPS und somit einer verminderten NADPH-Produktion zu sehen.

Auch DIP, eine Azodicarbonsäureverbindung (87), oxidiert intrazellulär GSH zu GSSG und erniedrigt die durch Glucose induzierte Insulinsekretion (86). Im Gegensatz dazu hat DIP + 2, das die Plasmamembran auf Grund seiner hydrophilen Eigenschaft nicht durchdringen kann, keinen Einfluß auf die Insulinsekretion und den GSH/GSSG-Quotienten (86).
Denkbar ist, daß auch SH-Gruppen von Rezeptoren in der Membran der ß-Zelle für den Sekretionsprozeß von Bedeutung sind, die wiederum mit dem Redoxzustand von Glutathion in Verbindung stehen dürften. Derartige Vermutungen wurden schon von verschiedenen Arbeitsgruppen angedeutet (59, 74, 80, 88, 89). Hinweise dafür geben p-CMB und Sulfonylharnstoffe, die zur Insulinsekretion führen, die Zellmembran aber nicht oder nur langsam permeieren (90, 91).
Durch den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten, der seinerseits vom NADPH/NADP-Quotienten abhängig ist, kann möglicherweise der Redoxzustand membranständiger SH-Gruppen moduliert werden. Eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur reduzierten Seite und somit mehr freien SH-Gruppen auf/in der Membran könnte über eine sterische Änderung der Membranstruktur zu einer veränderten Ionenpermeabilität und über weitere Stufen zur Insulinsekretion führen.

1.2. Fragestellung

1) Einfluß der Inkubationszeit

Ein Zusammenhang zwischen NADPH/NADP-Quotient und GSH/GSSG-Quotient wurde bereits beschrieben (s.S. 8). Bei Untersuchungen der Pyridinnukleotide in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde festgestellt, daß NAD(P)H (92, 93), NADPH (59) und NADH (94, 95) bei stimulatorischen Glucosemengen und bei Zusatz von Glucose plus Leucin (59) bereits nach einer Minute ansteigen.

Ein Teil dieser Arbeit bestand nun darin, zu untersuchen, ob auch hinsichtlich des GSH/GSSG-Quotienten ein ähnlich rascher Anstieg erfolgt.

2) Einfluß von exogenem Insulin

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einen hemmenden Effekt exogenen Insulins auf die Insulinsekretion beobachten (96 - 101). Von diesen Ergebnissen ausgehend, setzten Ammon und Verspohl (66) und Assal et al. (96) exogenes Insulin zu Untersuchungen am PPS ein. Dabei wurde eine Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten und eine Abnahme der Glucoseoxidation über den PPS beobachtet. Mit Methylenblau, einem Oxidationsmittel von NADPH (60) wurde sowohl der durch Glucose und Glucose plus Leucin erhöhte NADPH/NADP-Quotient (59) als auch der GSH/GSSG-Quotient (74) gesenkt.

In dieser Arbeit sollte daher die Frage geklärt werden, ob exogenes Insulin parallel zum NADPH-Gehalt auch den GSH-Gehalt der Insel zu erniedrigen vermag.

3) Einfluß von Leucin

Von der Aminosäure Leucin ist bekannt, daß sie - wie Glucose - zu einer Stimulation der Insulinsekretion führt (102 - 105). Bei Abwesenheit von Glucose bewirkt Leucin eine Insulinfreisetzung (106, 107), in Gegenwart von Glucose führt es zu einer Verstärkung der Glucosewirkung (104, 106, 107, 108). Andererseits wurde aber eine gegenseitige Hemmung von Glucose und Leucin beschrieben. Perifundierte Insein sezernierten in Anwesenheit von 5 mM Glucose weniger Insulin als bei Abwesenheit (109).

Leucin wird in die ß-Zelle aufgenommen (110, 111) und dort metabolisiert (112, 113). Unklar ist jedoch, ob eine Rezeptorbindung zur Sekretion führt (114) oder zur insulinotropen Wirkung von Leucin die Metabolisierung erforderlich ist (112). Ein Einfluß von Leucin auf die Glycolyse konnte nicht festgestellt werden (115). Dagegen ist die Produktion von $^{14}CO_2$ aus D- (U-^{14}C-Glucose) bei Untersuchungen von Gylfe und Sehlin (115) signifikant, bei Hellman et al. (112) nur geringfügig erhöht.

Untersuchungen der Pyridinnukleotide zeigten ebenfalls keine einheitlichen Ergebnisse. Während Ammon et al. (59) bei 10 mM Leucin in Gegenwart von 2 mg/ml Glucose einen Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten beobachteten, der NADH/NAD-Quotient sich aber kaum änderte, konnten Malaisse et al. (116) bei einer Konzentration von 20 mM Leucin bei Abwesenheit von Glucose zwar eine signifikante Änderung des NADH/NAD-Quotienten feststellen, aber keine Erhöhung des NADPH/NADP-Quotien-

ten. Panten et al. (109) beschrieben eine Zunahme der Fluoreszenz reduzierter Pyridinnukleotide. Die Methode ließ jedoch keine Unterscheidung zwischen NADPH und NADH zu.
Für eine Beteiligung von NADPH an der durch Leucin induzierten Insulinsekretion sprechen dennoch einige Befunde: Diamid, t-BHP und Methylenblau hemmen die durch Leucin hervorgerufene Insulinfreisetzung (59), ebenso wirkt exogenes Insulin (117). Durch weitere Untersuchungen sollte nun in dieser Arbeit festgestellt werden, ob

a) Leucin nur in Gegenwart von Glucose den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln verändert
b) exogenes Insulin einen Einfluß auf den durch Glucose und Leucin erhöhten GSH/GSSG-Quotienten hat.

4) Foeten und Neugeborene

Von verschiedener Seite wurde gezeigt (118 - 120), daß bei Foeten und Neugeborenen nach Glucosegabe keine Insulinsekretion auftritt. Sie setzt erst 2 Tage nach der Geburt ein (119) und ist von einer vermehrten Glucoseoxidation über den PPS begleitet (50). Möglicherweise werden über diesen Stoffwechselweg dann auch mehr Reduktionsäquivalente in Form von NADPH bereitgestellt.
Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit bestand nun darin, festzustellen, wie sich der Glutathiongehalt der Insel im foetalen und neugeborenen Stadium nach Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen verhält.

2. MATERIAL

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Erwachsene Tiere

Für die Versuche mit erwachsenen Tieren wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Das Körpergewicht der Versuchstiere betrug 200 - 350 g. Ihr Alter lag zwischen 3 und 5 Monaten. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24° und 26°C und 55 - 65 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.1.2. Foeten und Neugeborene

Die Zucht foetaler und neugeborener Ratten erfolgte nach der intermittierend monogamen Methode, d. h. die Verpaarung erfolgte 1:1, wobei ein männliches und ein weibliches Tier während der Paarung zusammen sind.

Das Gewicht der verwendeten Weibchen lag bei 200 - 250 g, das der Männchen bei 300 - 350 g.

Der Brunstzyklus der Ratten umfaßt 4 - 5 Tage. Davon fallen 2 Tage auf die Brunst, 2 - 3 Tage auf ein Ruhestadium (121). Setzt man die Tiere während der Brunstzeit 24 Stunden zusammen, so kann der Tag der Aufnahme beim Weibchen genau festgelegt werden. Die Tiere wurden während dieser Zeit in Makrolon-Käfigen auf einem Drahtgitter gehalten. Der Boden des Käfigs wurde mit weißem Papier bedeckt, um den gelblich-roten Vaginalpfropf nach der Kopulation zu erkennen.

Er sagt über den Erfolg der Begattung, der bei 97 % liegt, nichts aus. Danach wurden Männchen und Weibchen wieder getrennt.
Die Tragzeit der Ratten beträgt 21 - 23 Tage.
Einen Teil der Schwangeren ließ man auf natürliche Weise gebären. Die Jungen dieser Würfe blieben 5 Tage bei der Mutter und wurden von ihr gesäugt. Am 5. Tag wurden sie zu Versuchen mit Neugeborenen verwendet.
Ihr Gewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 10 - 11 g.
Beim anderen Teil der Schwangeren wurden am 22. Tag die Foeten durch Schnittentbindung (s. 3.2.1.) entnommen. Ihr Gewicht lag bei 4,5 - 5,5 g.
Pro Wurf wurden 8 - 14 junge Tiere erhalten.
Für die Versuche wurde jeweils der ganze Wurf verwendet, d. h. die Pankreata eines Wurfes wurden gemeinsam aufgearbeitet.

Ein Wurf wurde nicht verwendet, wenn die Anzahl der Tiere oder das Durchschnittsgewicht unter den genannten Werten lag.

2.2. Geräte

Stereomikroskop SM6	Nikon, Japan
Schüttelwasserbad	Köttermann KG, Hänigsen
Kühlzentrifuge UJ II KS	Christ GmbH, Osterode
Kühlzentrifuge Cryofuge 20-3	
Gefriertrocknungsanlage Beta	Christ GmbH, Osterode
Fluorimeter Fluoripoint	Bairo Atomic
Olivetti Tischcomputer	Olivetti GmbH
Ultraschallbad Econoclean	Spirig, Rapperswil, Schweiz
pH-Meter H5	Beckman Instruments GmbH, München
Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810	Eppendorf Gerätebau
Eppendorf-Mischer 5432	Netheler & Hintz GmbH, Hamburg

2.3. Chemikalien und Enzyme

Collagenase I (126-196 µE/mg)	Worthington Biochem. Corp. Freehold, USA
Collagenase II (0,7 U/mg)	Serva Heidelberg
α-D-Glucose	Serva Heidelberg
Rinderserumalbumin	Behringwerke Marburg
Glutathion, reduziert	Boehringer Mannheim
Glutathion, oxidiert	Boehringer Mannheim
o-Phthaldialdehyd	Sigma Corp. USA
Ratteninsulin	Novo Lab. Kopenhagen
Insulinantikörper	Novo Lab. Kopenhagen
N-Ethylmaleimid	Serva Heidelberg
L-Leucin	Serva Heidelberg
Insulin Radioimmunoassay Kit INSIK^{R}	Isotopendienst West, Sprendlingen

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4. Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1. Hanks' Lösung (122)

Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,60 g
KH_2PO_4	0,60 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,85 g
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Diese Stammlösung wurde vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt, mit 0,5 mg/ml Glucose versetzt, um die Substratversorgung der Inseln zu gewährleisten, und mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung

Nach der Vorschrift von Umbreit et al. setzt sich die Lösung folgendermaßen zusammen (123):

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um die Lösungen längere Zeit aufbewahren zu können, wurden drei getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung hergestellt:

Lösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,93 g
	Aqua bidest. ad	1000,00 ml
Lösung B:	$NaHCO_3$	21,10 g
	Aqua bidest. ad	1000,00 ml
Lösung C:	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,73 g
	Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Vor Gebrauch wurden je 10 ml der Lösungen A, B und C mit 70 ml Aqua bidest. gemischt. Diese Lösung wurde 10 Minuten mit Carbogen begast (95 % O_2 + 5 % CO_2). Nach Zusatz von 2 % Rinderalbumin wurde der pH auf 7,35 eingestellt. Für Inkubationszwecke mußte nur noch die jeweils im Medium gewünschte Substanz zugegeben werden.

2.4.3. Puffer für Ratteninsulinlösung

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	5,77 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,05 g
Thiomersal	0,24 g
NaCl	6,00 g
Aqua bidest. ad	1000,00 ml

Zur Herstellung der Insulinverdünnung wurde der Puffer mit 6 % Humanalbumin versetzt.

2.4.4. Phosphatpuffer für Glutathionbestimmung

0,1 M Natriumphosphat / 0,005 M EDTA

Lösung A:	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	17,8 g
	Titriplex III 0,1 M	50,0 ml
	Aqua bidest. ad	1000,0 ml
Lösung B:	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	13,799 g
	Titriplex III 0,1 M	50,0 ml
	Aqua bidest. ad	1000,0 ml

Vor Gebrauch wird soviel Lösung B in Lösung A gegeben, bis ein pH von 8 erreicht ist.

3. Methoden

3.1. Isolierung der Langerhansschen Inseln bei erwachsenen Ratten nach Lacy und Kostianovsky (124)

3.1.1. Operation

Bei den mit Äther narkotisierten Ratten wurde durch einen Längsschnitt vom Brustbein bis zum Becken und durch Querschnitte im Becken und an den Rippenbögen das Abdomen geöffnet. Das Duodenum wurde mit einer Pinzette unter den Leberlappen hervorgezogen. Dadurch wurde der Ductus hepaticus sichtbar und konnte zur Leber hin mit einem Zwirn abgebunden werden. Nach Abklemmen des Duodenums zum Magen hin, wurden in den Ductus hepaticus 10 ml eisgekühlte Hanks' Lösung injiziert, wodurch das Pankreas aufgebläht und gut sichtbar wurde. Mit einer Schere wurde es von Magen, Darm, Leber und Milz abgetrennt, in eine Petrischale mit eiskalter Hanks' Lösung gelegt und sämtliche Fettpartikel entfernt.

3.1.2. Isolierung der Langerhansschen Inseln

Die Zerkleinerung des Pankreas erfolgte mit einer Schere in möglichst gleichmäßig kleine Teilchen, die sich durch den Konus einer 5 ml-Rekordspritze aufsaugen ließen. Das Volumen in der Spritze wurde mit Hanks' Lösung auf 5 ml ergänzt und der Inhalt zu 30 mg Collagenase I in ein 20 ml-Schnappdeckelglas gegeben. Unter kräftigem Schütteln (Frequenz ca. 240 Bewegungen/Minute) ließ man die Collagenase bei 37°C in einem Wasserbad so lange auf die Pankreasteilchen

einwirken, bis das Gewebe homogen und schleimig aussah. Dies dauerte je nach Aktivität der Collagenase und Zerkleinerungsgrad des Pankreas etwa 10 Minuten.

Danach wurde der Inhalt des Schnappdeckelgefäßes in ein kleines Becherglas gekippt, zur weiteren Homogenisierung dreimal durch den Konus einer 5 ml-Rekordspritze gesaugt und durch ein Plastiksieb in einen 25 ml Meßzylinder, der mit ca. 15 ml eiskalter Hanks' Lösung gefüllt war, gegeben. Dadurch wurde die Collagenase-Reaktion gestoppt. Die Suspension wurde kräftig geschüttelt, dann ließ man die Teilchen absitzen. Aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichtes von Langerhansschen Inseln und exokrinen Partikeln, sinken die Inseln schneller zu Boden und war es möglich, beide voneinander zu trennen. Der Überstand wurde nach etwa 5 Minuten abgesaugt und der Inhalt des Meßzylinders erneut mit Hanks' Lösung aufgeschwemmt. Dieser Vorgang wurde etwa acht mal wiederholt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Inseln mit einer Mikropipette ausgelesen und vollständig von exokrinen Partikeln getrennt.

Alle Arbeitsgänge erfolgten unter Eiskühlung.

3.2. Isolierung der Langerhansschen Inseln bei neugeborenen und foetalen Ratten

3.2.1. Schnittentbindung

Unter Äthernarkose wurde die Bauchdecke der schwangeren Ratte durch einen Längsschnitt vom Brustbein zum Becken und durch Querschnitte im Becken und an den Rippenbögen geöffnet. Danach wurde der Uterus herausgezogen und so ausgebreitet, daß die Foeten in einer Reihe lagen und gut zu erkennen waren. Die Uterushaut wurde, beginnend in der Mitte des Uterus und auf der Seite, die den Blutgefäßen gegenüber liegt, aufgeschnitten. Die Foeten wurden entnommen und die Nabelschnur mit einer Schere durchtrennt.

3.2.2. Isolierung der Langerhansschen Inseln bei neugeborenen und foetalen Ratten

Die durch Schnitt entbundenen Foeten und die 5 Tage alten Neugeborenen wurden unter Äthernarkose dekapitiert.
Zur Isolierung des Pankreas wurden die jungen Tiere auf die rechte Körperseite gelegt und das Abdomen in Höhe des Magens, der durch die Haut als weißer Fleck zu erkennen war, mit einer Schere durch einen Schnitt geöffnet. Auf beide Seiten der Öffnung wurde mit zwei Fingern Druck ausgeübt, bis sich der Magen herausdrücken ließ, der bei Foeten farblos war, bei Neugeborenen eine weiße Farbe hatte. Mit einer stumpfen Pinzette wurde der Magen gehoben. Unterhalb des Magens wurde das Pankreas sichtbar, das bei Foeten eine weiße, bei Neugeborenen eine gelbliche Farbe aufwies. Das Pankreas wurde mit einer spitzen Pinzette von

Magen, Darm und Leber abgetrennt.
Auf diese Weise wurden bei allen Jungen eines Wurfs die Pankreata entnommen und in einer mit eiskalter Hanks' Lösung gefüllten Petrischale gesammelt.

Die Pankreata wurden mit einer Schere möglichst homogen zerkleinert und in eine 2 ml-Rekordspritze aufgesaugt. Das Volumen wurde mit Hanks' Lösung auf 2 ml ergänzt, in ein Schnappdeckelglas, das 5 mg Collagenase II enthielt, gegeben und 10 Minuten verdaut. Das Abstoppen der Reaktion und die Verdünnung wurden wie unter 3.1.2. durchgeführt.

3.3. Vorinkubation der Inseln

Die isolierten Inseln wurden in ein 5 ml-Gläschen gegeben, die dabei überführte Hanks' Lösung wurde nach dem Absetzen der Inseln abgesaugt. Zu den Inseln gab man 2ml KRB-Albumin-Lösung (s. 2.4.2.) mit einer substimulatorischen Glucosemenge (0,5 mg/ml). Mit einem Gummistopfen wurde das Glas verschlossen und über eine Kanüle mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast. Bei 37°C wurde das Gläschen 30 Minuten im Wasserbad geschüttelt (Frequenz 40 Bewegungen/Minute). Danach wurden die Inseln dreimal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen, um sie von anhaftendem Insulin zu befreien. Die Vorinkubation dient der Regeneration des Stoffwechsels nach dem Isolierungsprozeß.

3.4. Hauptinkubation

Je 5 Inseln wurden mit der Mikropipette in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße einsortiert und mit 1 ml Hauptinkubationsmedium versetzt (siehe Abschnitt 2.4.2.), eine bestimmte Zeit lang, wie bei den Versuchsserien angegeben, unter Carbogenbegasung bei 37°C im Wasserbad und langsamem Schütteln (40 Bewegungen/Minute) inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Gläschen in Eis gestellt, um alle Stoffwechselvorgänge zu unterbinden. Gelegentlich wurden zur Kontrolle der Inselfunktion 100 µl vom Überstand zur Insulinbestimmung abgenommen. Die Proben wurden bis zur Durchführung des Radioimmunoassays im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

3.5. Bestimmung von Glutathion

Beschreibung der Methode

1966 wurde von Cohn und Lyle (125) eine GSH-Bestimmung beschrieben. Hissin und Hilf (126) erweiterten diese Methode so, daß neben reduziertem auch oxidiertes Glutathion bestimmt werden kann. Von Ammon und Grimm wurde gezeigt, daß dieses Verfahren auch bei Inselgewebe eingesetzt werden kann (74).

GSH und GSSG bilden mit ortho-Phthaldialdehyd einen stark fluoreszierenden Komplex, der quantitativ ausgewertet werden kann. Bei pH 8 ist die Reaktion spezifisch für GSH. Unter pH 8 nimmt die Fluoreszenz ab, über pH 8 wird GSH teilweise zu GSSG umgewandelt.

GSSG wird bei pH 12 nach Umsetzung von GSH mit NEM bestimmt.

Im Gegensatz zur Methode nach Tietze (127) muß NEM bei dieser Bestimmung nicht entfernt werden.

Untersuchungen an Lebergewebe haben gezeigt (128), daß bei der GSSG-Bestimmung nach Hissin und Hilf (126) höhere Werte erhalten werden als bei der enzymatischen Cycling-Methode (127). Arbeiten in unserem Labor ergaben jedoch bei einem Vergleich beider Methoden an Pankreasinseln dieselben Resultate (73). Die Differenzen bei Lebergewebe lassen sich möglicherweise auf Substanzen zurückführen, die ebenfalls mit OPT fluoreszieren und in Inseln nicht oder nur in minimalen Mengen vorliegen. Da die OPT-Methode die gleichen Ergebnisse liefert, weniger zeitaufwendig ist und das Ausäthern von NEM entfällt, wurde das Verfahren nach Hissin und Hilf (126) weiterhin angewandt.

Durchführung der Bestimmung

Nach Vor- und Hauptinkubation wurden die Gefäße mit den Inseln in Eiswasser gestellt und das Medium unter dem Mikroskop möglichst rasch mit einer Kanüle, die mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden war, abgesaugt. Die Gefäße mit den Inseln wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer vorgekühlten Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Zur Denaturierung des Eiweißes und zur Verhinderung einer Oxidation von GSH bei der weiteren Aufbereitung wurden anschließend 100 µl 3 %ige m-Phosphorsäure lösung zugesetzt und in einem Ultraschallbad bei einer Frequenz von 40 000 Hz homogenisiert. Dann wurde bei 20 000 U/min und 0°C eine Stunde zentrifugiert, um die unlöslichen Zellbestandteile

abzutrennen. Im Überstand befand sich jetzt das freie, nicht proteingebundene Glutathion.
Vom Zentrifugenüberstand wurden von jeder Probe 80 µl entnommen.

3.5.1. Bestimmung von GSH

Zu jeder Probe (80 µl) wurden 44 µl (das Volumen wurde gelegentlich durch Titration überprüft, da MPA leicht hydrolisiert) einer 15 %igen Na_3PO_4-Lösung gegeben, um einen pH-Wert von 8 zu erhalten. Nach Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer pH 8 (s. Abschnitt 2.4.) wurden im 30-Sekundenabstand 50 µl OPT-Reagenz (10 mg in 10 ml Methanol zur Fluoreszenzspektroskopie gelöst) einpipettiert und die Proben gut durchmischt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten erfolgte die fluorimetrische Messung, ebenfalls im 30-Sekundenabstand.
Für die Eichkurve wurde folgende Verdünnungsreihe in der gleichen Weise wie die Proben behandelt:

20; 15; 10; 7,5; 5; 2,5; 0 ng GSH / bzw. GSSG in 80 µl MPA

3.5.2. Bestimmung von GSSG

Von jeder Probe wurden 80 µl zu 40 µl NEM-Lösung gegeben. Anschließend wurden 44 µl 15 %ige Na_3PO_4-Lösung zugesetzt und gut durchmischt. Nach 30-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit 0,5 ml 0,1 N NaOH ein pH von 12 eingestellt. Danach wurden wieder zu jeder Probe alle 30 Sekun-

den 50 µl OPT-Lösung zupipettiert und nach 15 Minuten die Fluoreszenz bestimmt.
Die Verdünnungsreihe für die Eichkurve wurde in gleicher Weise wie bei der GSH-Bestimmung beschrieben hergestellt.

3.5.3. Versuchsauswertung

In einen Olivetti-Tischcomputer wurden die Eichkurvenwerte eingegeben und der Korrelationskoeffizient und die Koeffizienten A und B der linearen Regressionsfunktion $y = A+Bx$ bestimmt. Die Berechnung der Werte für die unbekannten Proben erfolgte mit Hilfe dieser Daten.

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte ± SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen und Tabellen angegebenen Anzahl von Versuchen (n).
Für die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede wurde der Student's t-Test verwendet. $p<0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3.6. Einfluß der Reaktionszeit auf die Fluoreszenz

Um zu sehen, ob bei einer Reaktionszeit von 15 Minuten maximale Fluoreszenz des GSH-OPT-Komplexes vorliegt, wurden Verdünnungsreihen nach 15, 30 und 45 Minuten gemessen. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2

Reaktionszeit	% Emission				
	GSH-Konzentration (ng GSH / 80 µl)				
	0	5	10	15	20
15 Minuten	21,5	40,6	60,9	81,0	101,9
30 Minuten	23,9	39,8	57,6	76,7	97,3
45 Minuten	10,5	29,8	52,5	75,3	99,1

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, nimmt die Fluoreszenz des GSH-OPT-Komplexes mit steigender Reaktionszeit ab. Für die Bestimmungen wurde deshalb eine Reaktionszeit von 15 Minuten beibehalten.
Ähnliche Resultate erhielt Havu (129), der bei pH 8 und Zimmertemperatur eine maximale Fluoreszenz nach 20-minütiger Reaktionszeit, bei pH 7,2 nach 60 Minuten feststellte.

3.7. Insulinbestimmung

a) Diese wurde nach der Doppelantikörper-Methode von Söldner und Slone (130) mit dem INSIK^{R}-Kit in Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit Ratteninsulin hergestellt.
Vor der Bestimmung mußte jedoch der Antikörper abgetrennt werden, da er mit dem bei der Bestimmung zugesetzten Antikörper konkurriert und somit falsche Werte liefert.
Die Abtrennung erfolgte nach der Methode von Heding (131). Dabei wird Gesamtinsulin und freies ungebundenes Insulin bestimmt. Der Antikörper wird durch Säurezusatz von Insulin abgetrennt und mit Äthanol 96 % ausgefällt. Das freie Insulin wird nach Abtrennung des gesamten Insulin-Antikörper-Komplexes ausgefällt.

b) Gesamtinsulin
Zu 500 µl Inkubationsmedium werden 100 µl N HCl gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zu jeder Probe werden anschließend 3 ml Äthanol pipettiert und mit N NaOH (90 - 95 µl) auf pH 7,2 - 7,5 gebracht. Nach Schütteln fällt ein weißer Niederschlag aus, der bei 3000 U/Min. abzentrifugiert wird. Der Überstand wird abpipettiert, tiefgefroren und gefriergetrocknet.

c) freies Insulin
500 µl Inkubationsmedium werden bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach Zusatz von 2,5 ml 96 %igem Äthanol fällt ein

weißer Niederschlag aus. Nach dem Zentrifugieren werden die Proben wie unter b) beschrieben weiterbehandelt. Die gefriergetrockneten Proben können nun in 1 ml Pufferlösung zur Insulinbestimmung eingesetzt werden.

d) 100 µl dieser Lösung werden von den Proben und der Verdünnungsreihe in Plastikgläschen pipettiert. Der Antikörper wird nach Vorschrift gelöst und je 100 µl den Proben zugesetzt. Die Proben werden nach Schütteln 6 Stunden bei 4°C aufbewahrt, dann wird (^{125}J)-Insulin zugegeben. Nach 18-stündigem weiterem Stehen bei 4°C werden je 1 ml eisgekühlter Pufferlösung zupipettiert. Anschließend wird 20 Minuten bei 3500 U/Min. und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgegossen, die restliche Flüssigkeit mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Proben in einem γ-Counter gezählt.

e) Berechnung

Aus den Doppelbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet. Nach Berechnung des Quotienten aus der jeweiligen Zählrate der Proben und der Zählrate des Leerwertes, konnten aus der ebenso errechneten Eichkurve die Insulinwerte mit einem Computerprogramm bestimmt werden.

4. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1. Einfluß von Glucose auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Bei früheren Untersuchungen in unserem Labor war ein Anstieg an NADPH bereits nach einer Inkubationszeit von einer Minute beobachtet worden (59). Es sollte daher untersucht werden, ob der GSH-Gehalt nach 1-minütiger Inkubation ebenfalls erhöht ist und wie sich längere Inkubationszeiten von 5, 10 und 15 Minuten auf den GSH-Gehalt auswirken. Dazu wurden dem Inkubationsmedium 5,6 oder 16,7 mM Glucose zugesetzt. Die Bestimmung zum Zeitpunkt 0 wurde so durchgeführt, daß zu den Inseln Medium, das nur aus KRB-Albuminlösung bestand, gegeben und sofort wieder abgesaugt wurde..

Wie Tab. 3 und Abb. 1 zeigen, steigt der GSH-Gehalt bereits nach 1-minütiger Inkubation sowohl bei 5,6 als auch bei 16,7 mM Glucose an. Während in Gegenwart von 16,7 mM Glucose die GSH-Zunahme von 49,4 auf 80,4 pmol signifikant ist, kann mit 5,6 mM Glucose nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg von 49,4 auf 62,9 pmol verzeichnet werden. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute ist auch schon ein signifikanter Unterschied des GSH-Gehaltes zwischen 5,6 und des Wertes nach Inkubation mit 16,7 mM Glucose zu sehen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten ist bei 5,6 mM Glucose eine weitere GSH-Zunahme von 62,9 auf 88,0 pmol festzu-

stellen. 16,7 mM führen nur noch zu einem geringen weiteren GSH-Anstieg von 80,4 auf 88,3 pmol. Die GSH-Gehalte beider Glucosekonzentrationen sind nach 5-minütiger Inkubationszeit, vergleicht man sie mit einer Inkubationszeit von 0 Minuten, signifikant erhöht. Keine weitere Änderung des GSH-Gehaltes ist zwischen 5 und 10 Minuten bei 16,7 mM Glucose zu beobachten, in Gegenwart von 5,6 mM nimmt GSH von 88,0 auf 75,7 pmol pro 10 Inseln ab.

Änderungen des GSSG-Gehaltes nach den verschiedenen Inkubationszeiten sind Tab. 4 und Abb. 2 zu entnehmen. Innerhalb der ersten Minute fällt der GSSG-Gehalt von 48,8 auf 39,5 pmol bei 5,6 mM Glucose und auf 34,0 pmol in Gegenwart von 16,7 mM. Die Abnahme von GSSG ist bei Anwesenheit von 16,7 mM Glucose signifikant. Nach 5 Minuten Inkubationszeit zeigen sich bei beiden Glucosekonzentrationen keine wesentlichen Unterschiede zu den Meßwerten nach einer Minute. Wie die GSH- erreichen auch die GSSG-Gehalte nach 5 Minuten bei beiden Glucosekonzentrationen denselben Wert von etwa 35 pmol. Die Meßwerte sind nach dieser Inkubationszeit im Vergleich zu 0-minütiger Inkubation, d.h. sofortigem Absaugen des Mediums, signifikant erniedrigt. Bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten und einer Glucosekonzentration von 5,6 mM ist der GSSG-Gehalt im Vergleich zu 5 Minuten von 34,8 auf 41,2 pmol erhöht. Er ändert sich nach 15 Minuten nur geringfügig.
In Gegenwart von 16,7 mM Glucose nimmt der GSSG-Gehalt der Inseln nach 10 bzw. 15 Minuten noch weiter auf 32,8 bzw.

30,3 pmol pro 10 Inseln ab. Signifikante Unterschiede lassen sich bei beiden Werten zum Wert nach 0 Minuten Inkubationszeit feststellen.

Ein Vergleich der GSH/GSSG-Quotienten (Tab. 5, Abb. 3) zeigt, daß sie mit zunehmender Inkubationszeit bei 16,7 mM Glucose von 1,0 auf 2,4 nach 1 Minute auf 2,5 und 2,7 nach 5 bzw. 10 Minuten bis auf 3,3 nach 15 Minuten ansteigen. Auch in Gegenwart von 5,6 mM Glucose ist eine Zunahme des Quotienten im Vergleich zum Nullwert zu beobachten. Bei dieser Glucosekonzentration liegen die GSH/GSSG-Quotienten allerdings - mit Ausnahme des Wertes nach 5 Minuten - wesentlich niedriger. Innerhalb 1 Minute ist ein Anstieg von 1,0 auf 1,6 zu verzeichnen.

Nach 5 Minuten erreicht der Quotient bei 5,6 mM Glucose denselben Wert wie bei Inkubation mit 16,7 mM, nämlich 2,5. 10- und 15-minütige Inkubationszeiten führen in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose zu einem GSH/GSSG-Quotienten von 1,8 bzw. 1,7.

Der Gesamtglutathiongehalt (Tab. 6) der Langerhansschen Insel bleibt in Gegenwart von 5,6 und 16,7 mM Glucose bei den verschiedenen Inkubationszeiten annähernd konstant. Er beträgt etwa 155 pmol/10 Inseln und unterliegt nur geringfügigen Schwankungen. Diese können wohl darauf zurückgeführt werden, daß Gesamtglutathion nicht gemessen, sondern aus den GSH- und GSSG-Werten von Tab. 3 und 4 berechnet wurde.

Einfluß von Glucose auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Inkubationszeit Min.	GSH-Gehalt pmol / 10 Inseln				
	0	1	5	10	15
Glucosekonz. mM					
5,6	49,4±5,8 (21) A	62,9±5,4 (15) B	88,0±8,1 (22) D	75,7±5,0 (21) F	73,9±8,3 (9) H
16,7		80,4±6,2 (16) C	88,3±8,6 (25) E	88,7±7,2 (22) G	100,8±11,2 (9) J

Je 5 Inseln wurden in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mM Glucose inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AC: $p < 0,001$ AF: $p < 0,005$ AJ: $p < 0,001$
AD: $p < 0,001$ AG: $p < 0,001$ BC: $p < 0,05$
AE: $p < 0,001$ AH: $p < 0,025$ BD: $p < 0,025$

Tabelle 4

Einfluß von Glucose auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Inkubationszeit Min.	GSSG-Gehalt pmol / 10 Inseln				
	0	1	5	10	15
Glucosekonz. mM 5,6	48,8±3,2 (24) A	39,5±4,2 (19) B	34,8±2,0 (14) D	41,2±2,5 (17) F	42,4±6,2 (10) H
16,7		34,0±3,5 (16) C	35,4±1,4 (18) E	32,8±2,0 (18) G	30,3±2,5 (13) I

Je 5 Inseln wurden in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mM Glucose inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AC: $p < 0,005$ AE: $p < 0,005$, AI: $p < 0,001$
AD: $p < 0,005$ AG: $p < 0,001$

Tabelle 5

Einfluß von Glucose auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

GSH/GSSG-Quotient					
Inkubationszeit Min.	0	1	5	10	15
Glucosekonz. mM 5,6	1,0	1,6	2,5	1,8	1,7
16,7		2,4	2,5	2,7	3,3

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tab. 3 und 4 entnommen.

Tabelle 6

Einfluß von Glucose auf den Gehalt an Gesamtglutathion Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Ankubationszeit

	Gesamtglutathion pmol GSH/10 Inseln				
Inkubationszeit Min.	0	1	5	10	15
Glucosekonz. mM 5,6	147,0	141,9	157,6	158,1	158,7
16,7		148,4	159,1	154,3	161,4

Die Mittelwerte zur Berechnung des Gesamtglutathiongehaltes wurden den Tab. 3 und 4 entnommen.

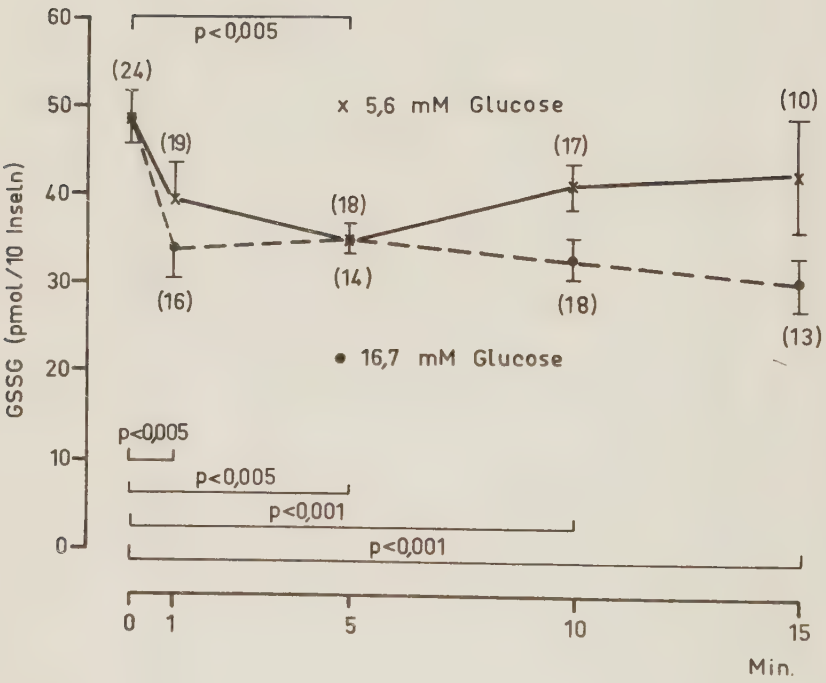


Abb. 2

Einfluß von Glucose auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

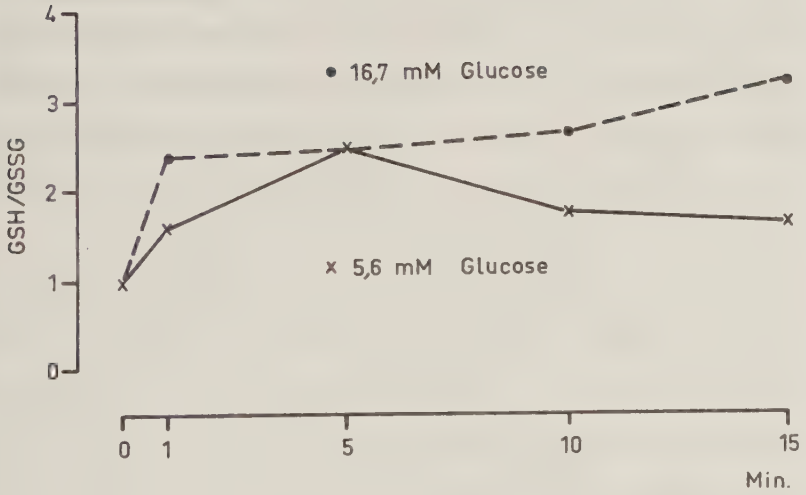


Abb. 3

Einfluß von Glucose auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tab. 3 und 4 entnommen.

4.2. Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

Bei Zusatz von 200, 400 und 800 µE/ml exogenen Insulins war bei früheren Untersuchungen eine Hemmung der Insulinsekretion (66), des NADPH/NADP-Quotienten (66) und des 6-PG/G-6-P-Quotienten (67) beobachtet worden, wobei 400 µE/ml bereits nach 5 Minuten zu einer Abnahme des NADPH-Gehaltes führten. Die Versuchsserie wurde bei 15-minütiger Inkubation und den genannten Konzentrationen an exogenem Insulin durchgeführt. Die Glucosekonzentrationen betrugen 5,6 und 16,7 mM.

Der Einfluß exogenen Insulins auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln ist in Tab. 7 und Abb. 4 dargestellt. 16,7 mM Glucose führen im Vergleich zu 5,6 mM zu einem signifikanten Anstieg des GSH-Gehaltes von 42,0 auf 56,0 pmol. Eine signifikante Hemmung durch exogenes Insulin ist sowohl bei 5,6 mM als auch bei 16,7 mM Glucose zu sehen und zwar bereits mit 200 µE/ml exogenen Insulins. Während bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose 200 µE/ml exogenen Insulins zur maximalen Hemmung von 42,0 auf 30,6 pmol führen und der Zusatz von 400 und 800 µE/ml keine weitere Abnahme von GSH bewirkt, kann in Gegenwart von 16,7 mM Glucose durch Erhöhung der Konzentration exogenen Insulins der GSH-Gehalt noch stärker verringert werden. Mit 800 µE/ml exogenen Insulins ist die Abnahme von GSH im Vergleich zum GSH-Gehalt ohne Insulinzusatz hoch signifikant. Dabei liegt GSH bei 31,5 pmol pro 10 Inseln, was etwa der Hemmung durch exogenes Insulin bei 5,6 mM Glucose auf einen GSH-Gehalt von 30 pmol je 10 Inseln entspricht.

Der GSSG-Gehalt der Insel (Tab. 8, Abb. 5) nimmt bei Inkubation mit exogenem Insulin in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose ab, in Gegenwart von 16,7 mM dagegen zu. Während in Gegenwart von 5,6 mM Glucose mit 200 und 400 µE/ml exogenen Insulins GSSG von 54,8 auf 38,9 pmol signifikant vermindert wird, ist mit 800 µE/ml ein geringer Anstieg auf 44,1 pmol im Vergleich zu den durch 200 u.400 µE/ml gehemmten Werten zu sehen. Bei Inkubation mit 16,7 mM Glucose nimmt der GSSG-Gehalt bei Zusatz von 200 und 400 µE/ml exogenen Insulins von 38,1 auf 47,9 bzw. 47,1 pmol zu. Ein weiterer Anstieg von GSSG auf 50,8 pmol ist mit 800 µE/ml festzustellen. Bei Inkubation mit 200 und 800 µE/ml exogenen Insulins ergeben sich bei dieser Glucosekonzentration signifikante Unterschiede in den GSSG-Gehalten im Vergleich zum GSSG-Gehalt ohne Insulinzusatz.

Der GSH/GSSG-Quotient (Tab. 9, Abb. 6) wird bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM durch keine der eingesetzten Insulinkonzentrationen verändert. Bei 16,7 mM Glucose nimmt er dagegen von 1,5 auf 0,9 bei Zusatz von 200 und 400 µE/ml ab. 800 µE/ml exogenen Insulins bewirken eine weitere Verminderung des GSH/GSSG-Quotienten auf 0,6.

Vergleicht man den Gesamtglutathiongehalt Langerhansscher Inseln in Gegenwart von exogenem Insulin (Tab. 10), so ist bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose nach Zusatz exogenen Insulins eine deutliche Abnahme von 151,6 auf 108,4 pmol/10 Inseln mit 200 µE/ml bzw. 107,7 pmol mit 400 µE/ml festzustellen. Der Gesamtglutathiongehalt wird dagegen bei Inkubation mit 16,7 mM Glucose durch exogenes Insulin nicht verändert.

Tabelle 7

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

	GSH-Gehalt pmol / 10 Inseln			
Exogenes Insulin µE/ml	0	200	400	800
Glucosekonz. mM 5,6	42,0±2,7 (35) A	30,6±2,4 (21) B	29,9±3,8 (21) C	30,1±3,6 (16) D
16,7	56,0±4,9 (17) E	40,6±3,2 (15) F	39,8±3,9 (17) G	31,5±1,8 (20) H

Je 5 Inseln wurden in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mM Glucose sowie 0, 200, 400, 800 µE/ml exogenen Insulins 15 Minuten inkubiert
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung: AB: $p < 0,01$ AD: $p < 0,02$ EF: $p < 0,02$ EH: $p < 0,001$
AC: $p < 0,01$ AE: $p < 0,01$ EG: $p < 0,02$ GH: $p < 0,05$

Tabelle 8

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

	GSSG pmol / 10 Inseln			
Exogenes Insulin µE/ml	0	200	400	800
Glucosekonz. mM 5,6	54,8±3,6 (22) A	38,9±4,0 (15) B	38,9±3,1 (19) C	44,1±5,9 (11) D
16,7	38,1±2,7 (21) E	47,9±4,0 (19) F	47,1±4,3 (23) G	50,8±5,7 (12) H

Je 5 Inseln wurden in Gegenwart von 5,6 oder 16,7 mM Glucose sowie 0, 200, 400, 800 µE/ml exogenen Insulins 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AB: $p < 0,01$ AE: $p < 0,001$ EF: $p < 0,05$
AC: $p < 0,005$ EH: $p < 0,05$

Tabelle 9

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

	GSH/GSSG			
Exogenes Insulin µE/ml	0	200	400	800
Glucosekonz. mM 5,6	0,8	0,8	0,8	0,7
16,7	1,5	0,9	0,9	0,6

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tabellen 7 und 8 entnommen.

Tabelle 10

Einfluß von exogenem Insulin auf den Gehalt an Gesamtglutathion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

	Gesamtglutathion pmol GSH / 10 Inseln			
Exogenes Insulin µE/ml	0	200	400	800
Glucosekonz. mM 5,6	151,6	108,4	107,7	118,3
16,7	132,2	136,4	134,0	133,1

Die Mittelwerte zur Berechnung des Gesamtglutathiongehaltes wurden den Tabellen 7 und 8 entnommen.

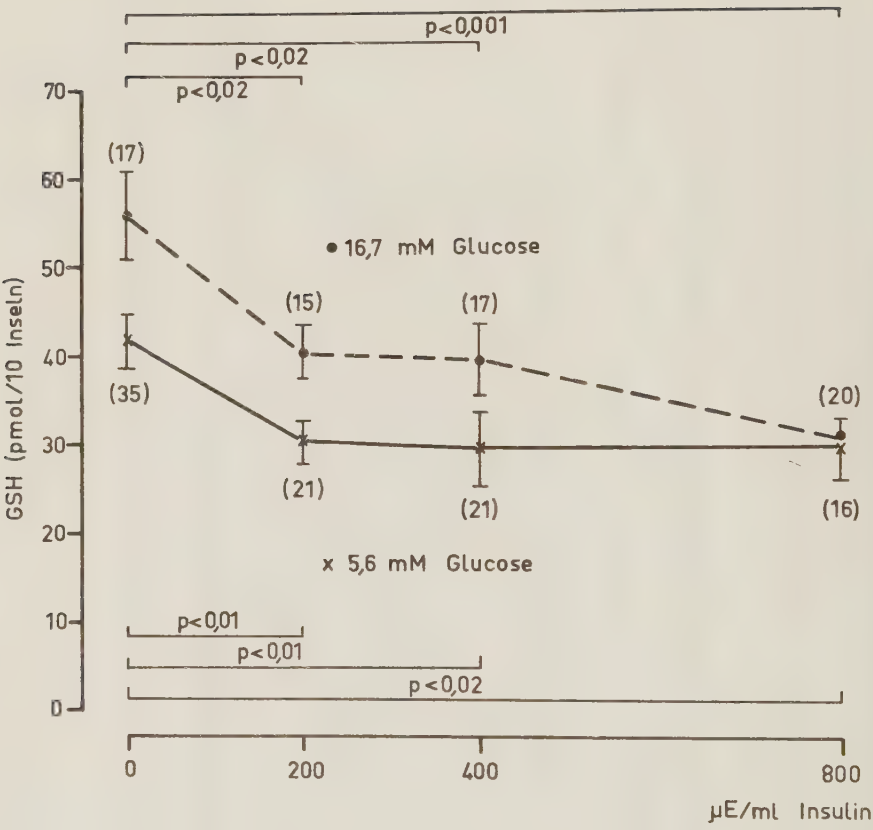


Abb. 4

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

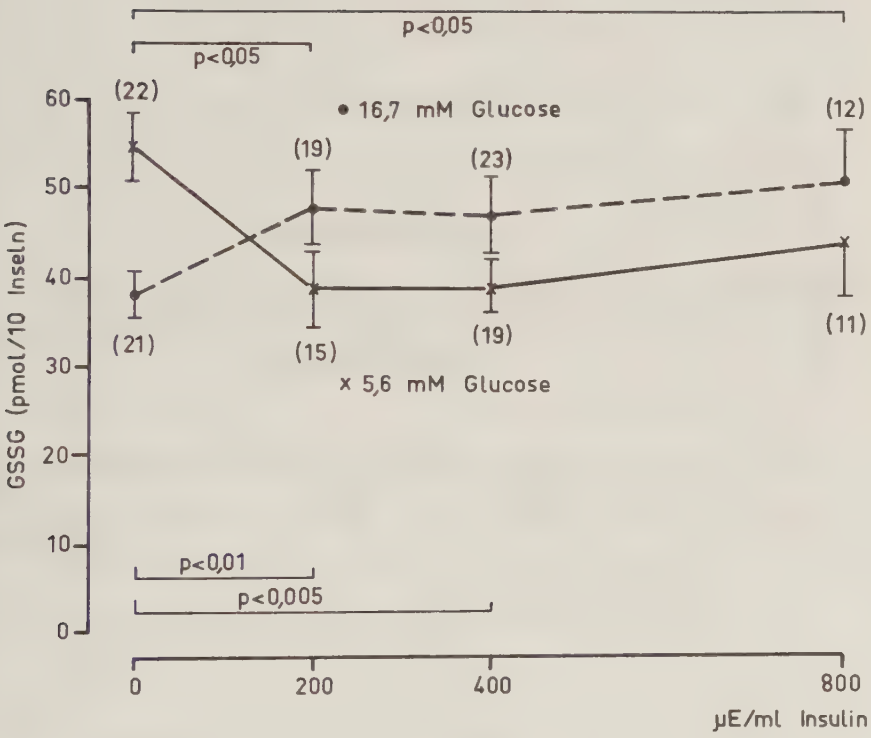


Abb. 5

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

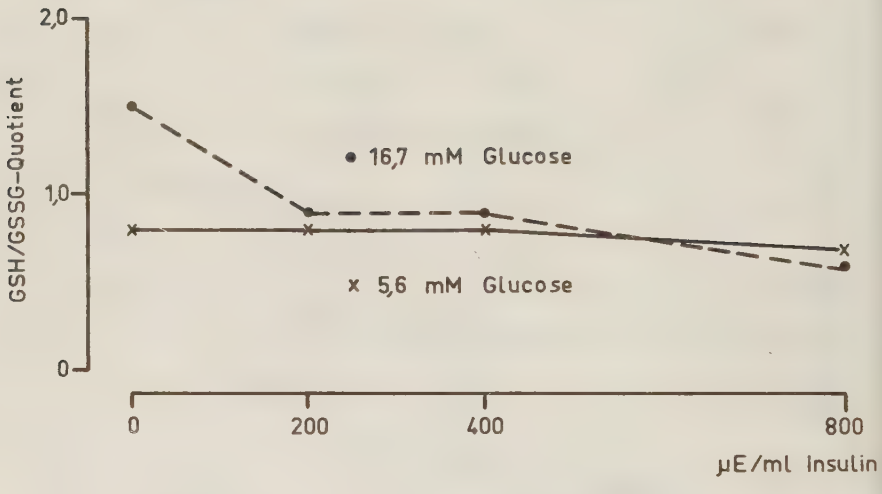


Abb. 6

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tabellen 7 und 8 entnommen.

4.3.1. Einfluß von Leucin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose

In dieser Versuchsreihe wurde die Inkubationszeit auf 90 Minuten festgelegt, um die Ergebnisse mit anderen Untersuchungen unseres Labors korrelieren zu können. Da durch sezerniertes Insulin eine Feedback-Hemmung auftreten kann, wurde Insulin-Antikörperlösung mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin zugesetzt. Leucin wurde in einer Konzentration von 10 mM verwendet. Bei Untersuchungen des NADPH-Gehaltes mit verschiedenen Leucinkonzentrationen hatte sich gezeigt, daß Leucin in dieser Konzentration in Gegenwart von 5,6 mM Glucose zu einer signifikanten Steigerung von NADPH führt (58). Ferner war es in Anwesenheit von 5,6mM Glucose hinsichtlich der NADPH-Erhöhung wirksamer als bei höheren Glucosekonzentrationen.

Wie die Daten aus Tab. 11 und Abb. 7 zeigen, vermag Leucin in Abwesenheit von Glucose den GSH-Gehalt der Langerhansschen Insel im Vergleich zum Pufferwert nicht zu erhöhen. Beide GSH-Werte liegen bei 60 pmol/10 Inseln. Setzt man aber dem Inkubationsmedium neben Leucin 5,6 mM Glucose zu, so wird GSH signifikant auf 93,4 pmol erhöht. 5,6 mM Glucose allein rufen nur eine minimale GSH-Zunahme im Vergleich zum Pufferwert von 60 auf 70,8 pmol hervor.
Auch der GSSG-Gehalt (Tab. 11, Abb. 8) wird durch 10 mM Leucin allein im Vergleich zum Leerwert nicht verändert und

5,6 mM Glucose führen ohne weiteren Zusatz nur zu einer geringen Zunahme von 36,4 auf 43,1 pmol. Setzt man aber dem Inkubationsmedium jedoch eine Kombination von Leucin und Glucose zu, wird der GSSG-Gehalt im Vergleich zu 5,6 mM Glucose von 43,1 auf 29,0 pmol/10 Inseln vermindert.
Der GSH/GSSG-Quotient (Tab. 12, Abb. 9) wird bei Inkubation mit 5,6 mM Glucose allein von 1,6 auf 3,2 bei Inkubation mit einer Kombination von Glucose und Leucin gesteigert. 10 mM Leucin und 5,6 mM Glucose allein bewirken im Vergleich zum Pufferwert keine Änderung des GSH/GSSG-Quotienten.

Der Gesamtglutathiongehalt wird im Vergleich zum Pufferwert durch Zusatz von Leucin zum Inkubationsmedium nicht verändert (Tab. 12). Glucose führt zu einem geringen Anstieg von 132,8 pmol/10 Inseln bei Inkubation ohne Glucose oder Leucin auf 157,0 pmol in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose. Dieser Gehalt an Gesamtglutathion wird auch durch Kombination von Glucose und Leucin im Inkubationsmedium nicht verändert.

Tabelle 11

Einfluß von Leucin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose

	Puffer	Glucose 5,6 mM	Leucin 10 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM
GSH pmol/10 Inseln	60,0±4,8 (18) A	70,8±5,7 (19) B	63,4±6,3 (19) C	93,4±6,7 (21) D
GSSG pmol/10 Inseln	36,4±4,3 (23) E	43,1±4,6 (23) F	32,7±4,4 (20) G	29,0±3,2 (22) H

Je 5 Inseln wurden entweder ohne oder in Gegenwart von 5,6 mM Glucose oder 10 mM Leucin oder in Kombination von beiden 90 Minuten mit Insulinantikörper mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AD: $p < 0,001$ BD: $p < 0,02$ CD: $p < 0,005$ FH: $p < 0,02$

Tabelle 12

Einfluß von Leucin auf den GSH/GSSG-Quotienten und den Gehalt an Gesamtglutathion Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose

	Puffer	Glucose 5,6 mM	Leucin 10 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM
GSH/GSSG	1,7	1,6	1,9	3,2
Gesamtglutathion pmol GSH/10 Inseln	132,8	157,0	128,8	151,4

Die Mittelwerte zur Berechnung des GSH/GSSG-Quotienten und des Gesamtglutathiongehaltes wurden Tab. 11 entnommen.

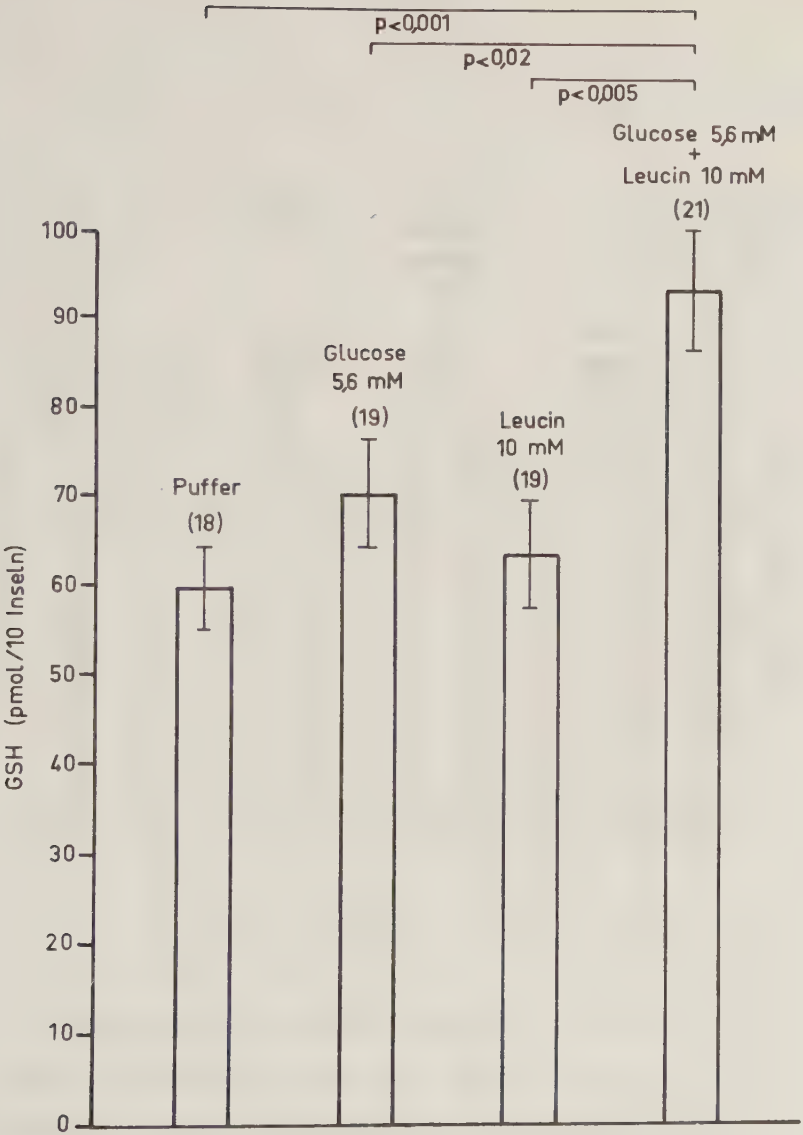


Abb. 7

Einfluß von Leucin auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten in Gegenwart von Insulinantikörper mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

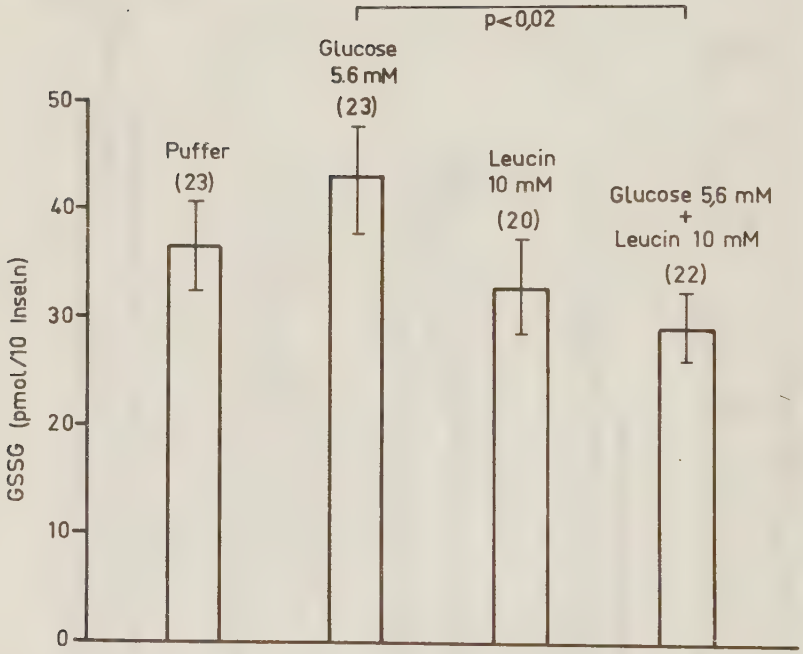


Abb. 8

Einfluß von Leucin auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten in Gegenwart von Insulinantikörper mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

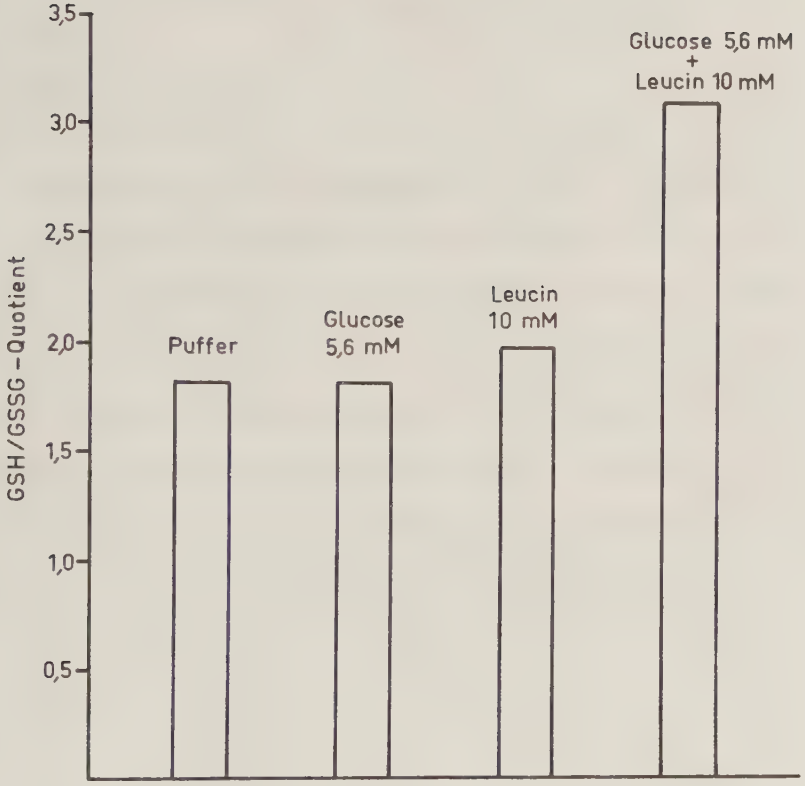


Abb. 9

Einfluß von Leucin auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte mit und ohne Zusatz von Glucose

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden Tab. 11 entnommen

4.3.2. Einfluß von Leucin auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in An- und Abwesenheit von Glucose

Tab. 13 und Abb. 10 zeigen, daß 5,6 mM Glucose die Insulinsekretion im Vergleich zum Pufferwert nicht erhöhen. 10 mM Leucin führen dagegen in Abwesenheit von Glucose zu einer signifikanten Zunahme der Insulinsekretion von 67,2 auf 170,7 µE IRI/ml. In Anwesenheit von 5,6 mM Glucose ist mit Leucin eine im Vergleich zu Glucose allein hoch signifikante Erhöhung der Insulinsekretion zu verzeichnen. Vergleicht man die Insulinfreisetzung nach Inkubation mit Leucin ohne Glucose und Leucin plus Glucose, so ist festzustellen, daß die durch Leucin erhöhte Insulinsekretion durch 5,6 mM Glucose noch weiter gesteigert werden kann und zwar von 170,7 auf 492,8 µE IRI/ml.

Tabelle 13

Einfluß von Leucin auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhansschen Inseln

	Puffer	Glucose 5,6 mM	Leucin 10 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM
Insulin µE IRI/5 Inseln/ml · 90 Minuten	67,2 ±21,7 (9) A	68,1±16,8 (9) B	170,7±29,0 (9) C	492,8±40,4 (9) D

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium entweder ohne oder in Gegenwart von 5,6 mM Glucose oder 10 mM Leucin oder in Kombination von beiden 90 Minuten mit Insulinantikörper mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AC: $p < 0,02$ BC: $p < 0,01$
BD: $p < 0,001$ CD: $p < 0,001$

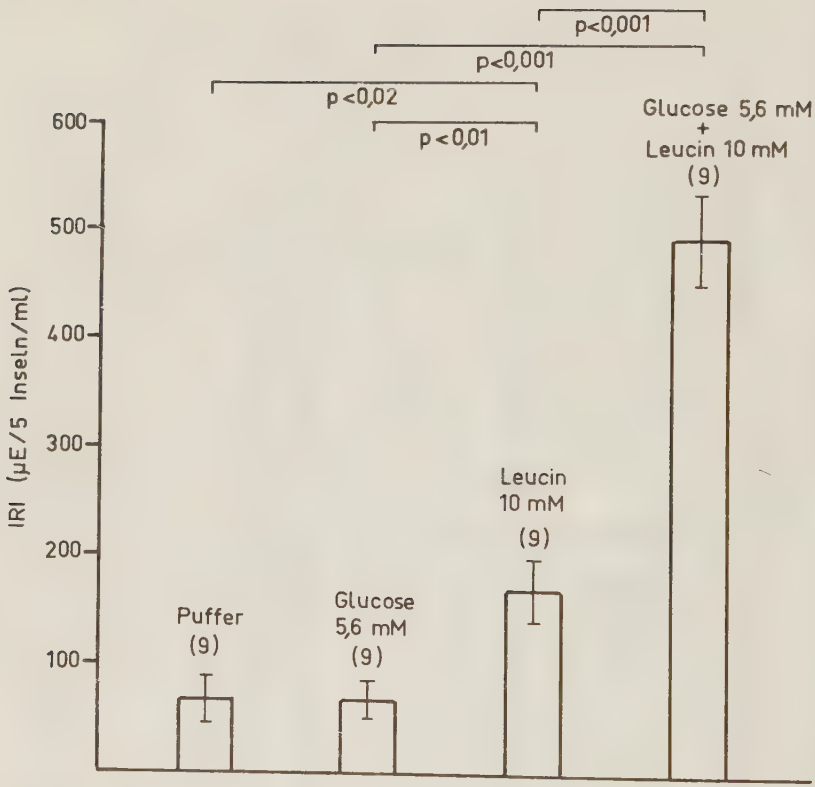


Abb. 10

Einfluß von Leucin auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten in Gegenwart von Insulinantikörper mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

4.4. Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH- und GSSG Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose und Leucin

Exogenes Insulin hemmt die durch Glucose und Leucin induzierte Insulinsekretion in einer Konzentration von 200 µE/ml signifikant (117). In der folgenden Versuchsreihe wurden - wie bei den Untersuchungen mit Glucose unter 4.2. - 200, 400 und 800 µE/ml exogenes Insulin eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Zur Kontrolle wurden in jedem Versuch Proben mit 16,7 mM Glucose mit und ohne Insulinzusatz mitbestimmt. Dadurch konnte festgestellt werden, ob die Inseln auf stimulatorische Glucosekonzentrationen ansprachen und mit exogenem Insulin gehemmt wurden.

Wie Tab. 14 und Abb. 11 zeigen, ist der GSH-Gehalt bei Steigerung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM signifikant von 76,3 auf 99,6 pmol erhöht. Leucin - in Gegenwart von 5,6 mM Glucose - bewirkt ebenfalls eine deutliche Steigerung des GSH-Gehaltes auf 92,5 pmol. Dabei liegt der durch 5,6 mM Glucose plus Leucin stimulierte Anstieg des GSH-Wertes nicht höher als der durch 16,7 mM Glucose stimulierte. Exogenes Insulin hemmt in keiner der verwendeten Konzentrationen den durch Glucose plus Leucin erhöhten GSH-Gehalt signifikant, wenn auch eine geringfügige Abnahme von 92,5 auf etwa 85 pmol zu erkennen ist. Der als Kontrolle dienende, mit 16,7 mM Glucose stimulierte GSH-Wert wird dagegen durch 400 µE/ml exogenen Insulins signifikant gehemmt.

Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei GSSG (Tab. 14, Abb. 12).

Von 5,6 nach 16,7 mM Glucose ist GSSG signifikant von 32,4 auf 19,2 pmol erniedrigt. Vergleicht man die GSSG-Gehalte nach Inkubation mit Glucose und Leucin mit den durch Glucose allein erzielten Werten, so ist festzustellen, daß GSSG von 32,4 auf 18,8 pmol abfällt. 200 µE/ml exogenes Insulin führen bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose und 10 mM Leucin zu einer Zunahme des GSSG-Gehaltes Langerhansscher Inseln von 18,8 auf etwa 26 pmol, 800 µE/ml exogenen Insulins steigern den GSSG-Gehalt signifikant von 18,8 auf 31,1 pmol pro 10 Inseln. Bei Inkubation mit 16,7 mM Glucose alleine wird der GSSG-Gehalt im Vergleich zu 5,6 mM herabgesetzt. 400 µE/ml exogenen Insulins erhöhen diesen verminderten GSSG-Gehalt dagegen signifikant von 19,2 auf 32,1 pmol/10 Inseln.

Der GSH/GSSG-Quotient (Tab. 15, Abb. 13) ist bei Steigerung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM von 2,4 auf 5,2 erhöht. Auch Leucin führt in Gegenwart von 5,6 mM Glucose zu einer Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten von 2,4 auf 4,9. Exogenes Insulin in Konzentrationen von 200 und 400 µE/ml senkt den durch Glucose plus Leucin erhöhten GSH/GSSG-Quotienten von 4,9 auf 3,3, bei Zusatz von 800 µE/ml auf 2,8.

Der durch 16,7 mM Glucose erhöhte GSH/GSSG-Quotient wird dagegen bereits durch 400 µE/ml exogenen Insulins von 5,2 auf 2,4 vermindert.

Der Gesamtglutathiongehalt (Tab. 15) wird bei Inkubation mit 10 mM Leucin plus 5,6 mM Glucose durch exogenes Insulin in Konzentrationen von 200 und 400 µE/ml nicht verändert und liegt bei 135 pmol/10 Inseln. 800 µE/ml exogenes Insulin

führen zu einem geringen Anstieg von 130,1 pmol bei Inkubation mit Leucin und Glucose auf 148,0 nach Zusatz von Insulin.

Tabelle 14

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln in Gegenwart von Glucose und Leucin

	Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM				Glucose 16,7 mM	
		Exogenes Insulin µE/ml					
		0	200	400	800	0	400
GSH pmol/10 Inseln	76,3±5,6 (16) A	92,5±5,2 (20) B	85,5±5,4 (18) C	83,5±7,0 (17) D	85,8±4,8 (17) E	99,6±7,7 (17) L	76,3±4,8 (15) M
GSSG pmol/10 Inseln	32,4±4,0 (14) F	18,8±3,1 (15) G	26,1±5,2 (15) H	25,7±4,1 (17) J	31,1±4,5 (14) K	19,2±3,9 (11) N	21,1±4,5 (14) O

Je 5 Inseln wurden in Gegenwart von 5,6 mM Glucose und 10 mM Leucin sowie 0, 200, 400 und 800 µE/ml exogenen Insulins 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AB: $p < 0,05$ GK: $p < 0,05$ AL: $p < 0,025$ FN: $p < 0,05$
FG: $p < 0,02$ LM: $p < 0,02$ NO: $p < 0,05$

Tabelle 15

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH/GSSG-Quotienten und den Gehalt an Gesamtglutathion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose und Leucin

	Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM				Glucose 16,7 mM	
	Exogenes Insulin µE/ml						
	0	0	200	400	800	0	400
GSH/GSSG	2,4	4,9	3,3	3,3	2,8	5,2	2,4
Gesamtglutathion pmol GSH/10 Inseln	141,1	130,1	137,7	134,9	148,0	138,0	140,5

Die Mittelwerte zur Berechnung des GSH/GSSG-Quotienten und des Gesamtglutathiongehaltes wurden Tab. 14 entnommen.

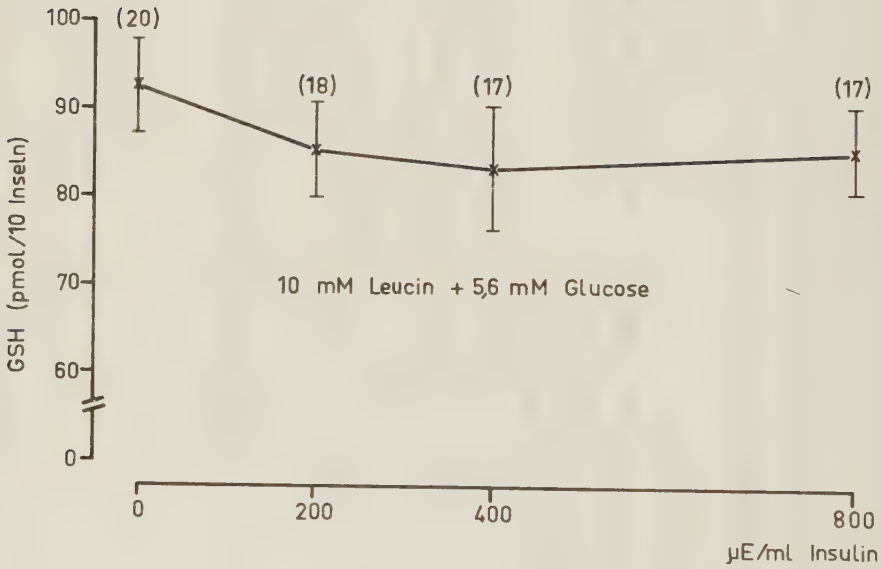


Abb. 11

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose und Leucin

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

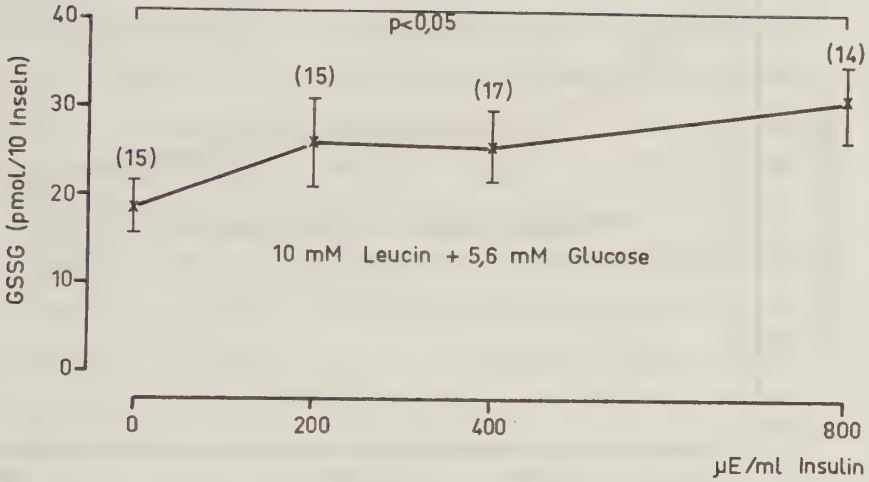


Abb. 12

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose und Leucin

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

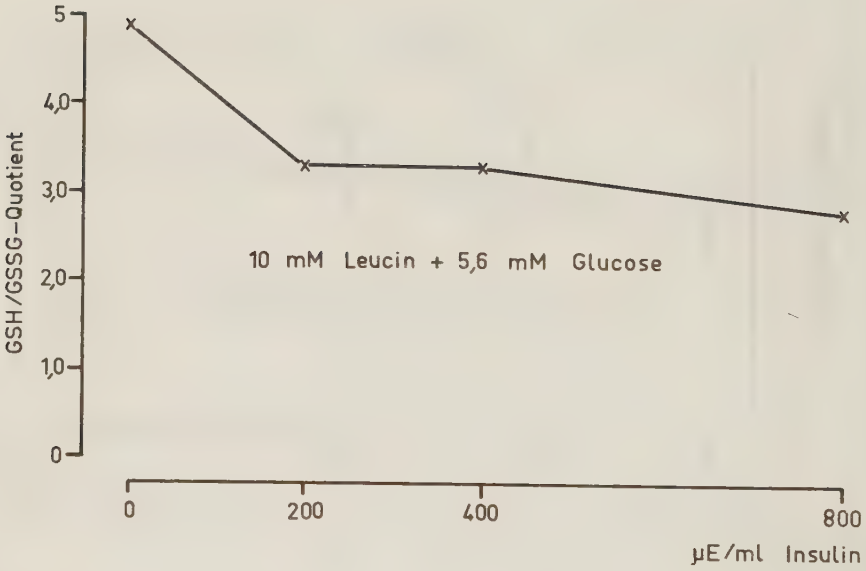


Abb. 13

Einfluß von exogenem Insulin auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von Glucose und Leucin

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden Tab. 14 entnommen

4.5. Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den GSH- und GSSG-Gehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, 5 Tage alten Neugeborenen und Foeten

Bei Untersuchungen unseres Labors war bei 15-minütiger Inkubationszeit eine signifikante Zunahme des GSH-Gehaltes nach Glucosekonzentrationen von 5,6 auf 16,7 mM festgestellt worden (73), während bei 90-minütiger Inkubation nur ein schwacher Anstieg beobachtet wurde. Dies kann durch eine Hemmwirkung des in das Medium sezernierten Insulins erklärt werden, da bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten beträchtliche Mengen Insulin in das Medium abgegeben werden, die sowohl die Insulinsekretion (66) als auch den NADPH/NADP- (66) sowie den GSH/GSSG-Quotienten (73) erniedrigen. Bei 15-minütiger Inkubationszeit erfolgt noch keine nennenswerte Insulinsekretion und der NADPH/NADP- (62) und GSH/GSSG-Quotient (73) zeigt eine von der Glucosekonzentration abhängige Zunahme. Für die Versuchsreihe wurde deshalb eine Inkubationszeit von 15 Minuten gewählt.

a) Erwachsene

Aus Tab. 16 und Abb. 14 ist zu entnehmen, daß der GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln erwachsener Ratten mit steigender Glucosekonzentration zunimmt. Die GSH-Konzentration liegt in Abwesenheit von Glucose bei 37,2 pmol/10 Inseln und steigt in Gegenwart von Glucose dosisabhängig von 35,1 pmol bei 5,6 mM Glucose auf 42,3 pmol bei 11,2 mM und 57,4 pmol bei 16,7 mM Glucose an. Signifikante Unterschiede sind von 0, 5,6 und 11,2 mM nach

16,7 mM Glucose festzustellen. Analog zur Zunahme von GSH fand sich eine - ebenfalls dosisabhängige - Abnahme von GSSG (Tab. 17 Abb. 15) von 42,6 pmol/10 Inseln in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose auf 21,6 pmol bei 11,2 mM und auf 17,4 pmol bei Anwesenheit von 16,7 mM Glucose. Signifikanzen konnten aus den Werten von 0 nach 11,2 und 16,7 mM Glucose und 5,6 nach 11,2 und 16,7 mM berechnet werden.

Der GSH/GSSG-Quotient liegt in Abwesenheit von Glucose bei 1,1. Zusatz von Glucose führt zu einem Anstieg von 0,8 bei 5,6 mM Glucose auf 3,3 in Gegenwart von 16,7 mM (Tab. 18, Abb. 16).

b) Neugeborene

Wie aus den Abbildungen 14 und 15 ersichtlich ist, verlaufen die Dosis-Wirkungskurven von GSH und GSSG bei Neugeborenen ähnlich wie bei Erwachsenen.

Die GSH-Gehalte (Tab 16, Abb. 14) liegen allerdings bei niedrigeren Glucosekonzentrationen (5,6 mM und 11,2 mM) bei Neugeborenen um etwa 6 pmol höher als bei Erwachsenen, in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose sind die GSH-Werte bei Erwachsenen und Neugeborenen gleich. Bei neugeborenen Ratten nimmt GSH von 40,6 pmol bei Inkubation mit 5,6 mM Glucose signifikant auf 57,7 pmol/10 Inseln in Gegenwart von 16,7 mM Glucose zu. Von 5,6 auf 11,2 mM Glucose ist eine Zunahme um 8 pmol zu verzeichnen.

Entsprechend dem Anstieg von GSH zeigt sich bei Neugeborenen ein dosisabhängiger Abfall von GSSG (Tab. 17, Abb. 15)

von 34,1 pmol in Gegenwart von 5,6 mM Glucose auf 28,1 pmol mit 11,2 mM und auf 23,8 pmol in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose. Bei Steigerung der Glucosekonzentration auf 16,7 mM ergeben sich im Vergleich zu 0 und 5,6 mM signifikante Unterschiede in den GSSG-Gehalten.

Mit der Erhöhung der Glucosekonzentration ist ein Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten (Tab. 18, Abb. 16) von 1,2 in Gegenwart von 5,6 mM Glucose auf 2,4 bei Inkubation mit 16,7 mM Glucose verbunden. Die Zunahme des Quotienten ist nur halb so groß wie bei den Inseln von erwachsenen Tieren. Ursache hierfür ist ein höherer GSH/GSSG-Quotient neugeborener Tiere bei niedriger Glucosekonzentration und ein geringerer Anstieg des Verhältnisses GSH:GSSG bei Steigerung der Glucosekonzentration.

c) Foeten

Im Gegensatz zu Erwachsenen und Neugeborenen findet sich bei Foeten bei keiner der verwendeten Glucosekonzentrationen eine signifikante Änderung des GSH-Gehaltes (Tab. 16, Abb. 14). Von 5,6 bzw. 11,2 mM Glucose auf 16,7 mM ist zwar ein geringer Anstieg zu erkennen. Er ist jedoch nicht signifikant. Die GSH-Werte der Foeten liegen bei etwa 30 pmol pro 10 Inseln und somit niedriger als die von Erwachsenen und Neugeborenen.

Auch der GSSG-Gehalt (Tab. 17, Abb. 15) von Pankreasinseln foetaler Ratten wird durch Glucose nicht beeinflußt. Mit etwa 20 pmol/10 Inseln entspricht er den Werten von Inseln erwachsener und neugeborener Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glucose.

Bei der Berechnung des foetalen GSH/GSSG-Quotienten ist ein geringfügiger Anstieg von 1,5 in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose auf 2,2 bei 16,7 mM Glucose festzustellen (Tab. 18, Abb. 16).

Bei einem Vergleich der GSH/GSSG-Quotienten von Foeten mit denen von erwachsenen und neugeborenen Ratten ist festzustellen, daß der GSH/GSSG-Quotient in Gegenwart von 5,6 mM Glucose bei foetalen Inseln mit einem Wert von 1,5 etwa doppelt so hoch ist wie bei Inseln erwachsener Tiere, deren GSH/GSSG-Quotient bei 0,8 liegt. Auch zwischen den Inseln von Neugeborenen und Foeten ist bei einer Glucosekonzentration von 5,6 mM ein Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten von 1,2 bei neugeborenen Ratten auf 1,5 bei Foeten zu beobachten. In Anwesenheit von 16,7 mM Glucose ist dagegen der GSH/GSSG-Quotient foetaler Inseln mit einem Wert von 2,2 niedriger als der von neugeborenen und erwachsenen Tieren mit Werten von 2,4 bzw. 3,3.

Tab. 19 zeigt, daß der Gesamtglutathiongehalt bei Foeten geringer ist als bei neugeborenen und erwachsenen Ratten. Dieser Befund korreliert mit der Inselgröße von Foeten und neugeborenen und erwachsenen Ratten. Der Gesamtglutathiongehalt liegt im foetalen Alter bei etwa 70 pmol pro 10 Inseln und erreicht bei 5 Tage alten Ratten bereits Werte von 110 pmol, die denen erwachsener Tiere entsprechen. Innerhalb der Altersgruppen sind zwar mit zunehmender Glucosekonzentration geringfügige Schwankungen vorhanden, eine Zu- oder Abnahme kann daraus jedoch nicht abgelesen werden.

Tabelle 16

Einfluß von Glucose auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

GSH pmol/10 Inseln	Glucosekonzentration mM 0	5,6	11,2	16,7
Erwachsene	37,2±2,6 (17) A	35,1±2,9 (19) B	42,3±4,5 (19) C	57,4±4,9 (18) D
Neugeborene	46,2±2,7 (25) E	40,6±3,5 (25) F	48,3±3,9 (26) G	57,7±5,0 (27) H
Foeten	32,0±3,2 (19) I	30,9±4,0 (19) K	28,5±2,9 (19) L	37,0±3,1 (20) M

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AD: $p < 0,005$ CD: $p < 0,05$
BD: $p < 0,001$ FH: $p < 0,01$

Tabe : 17

Einfluß von Glucose auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

GSSG pmol/10 Inseln	Glucosekonzentration mM 0	5,6	11,2	16,7
Erwachsene	34,3±5,4 (17) A	42,6±6,1 (18) B	21,6±3,1 (18) C	17,4±3,0 (18) D
Neugeborene	32,0±2,8 (22) E	34,1±3,3 (22) F	28,1±3,2 (23) G	23,8±2,6 (20) H
Foeten	20,0±2,6 (20) I	21,1±3,2 (20) K	17,2±1,8 (20) L	16,6±2,6 (20) M

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: AC: $p < 0,05$ BC: $p < 0,005$ EH: $p < 0,05$
AD: $p < 0,01$ BD: $p < 0,001$ FH: $p < 0,025$

Tabelle 18

Einfluß von Glucose auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

GSH/GSSG	Glucosekonzentration mM				
	0	5,6	11,2	16,7	$\Delta_{0 - 16,7}$
Erwachsene	1,1	0,8	2,0	3,3	2,2
Neugeborene	1,4	1,2	1,7	2,4	1,0
Foeten	1,6	1,5	1,7	2,2	0,6

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tab. 16 und 17 entnommen

Tabelle 19

Einfluß von Glucose auf den Gehalt an Gesamtglutathion Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Gesamtglutathion pmol GSH/10 Inseln	Glucosekonzentration 0	5,6	11,2	16,7
Erwachsene	105,8	120,3	85,5	92,2
Neugeborene	110,2	108,8	104,5	105,3
Foeten	72,0	73,1	62,9	70,2

Die Mittelwerte zur Berechnung des Gesamtglutathiongehaltes wurden den Tab. 16 und 17 entnommen

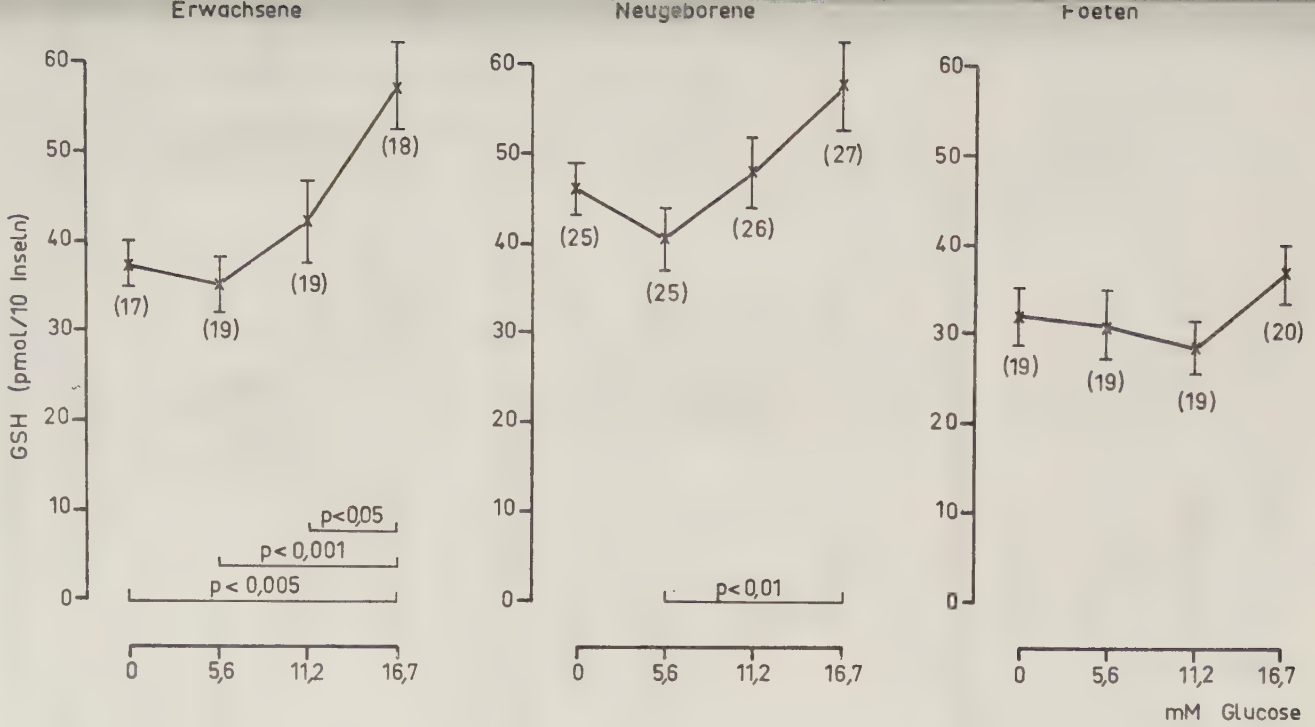


Abb. 14

Einfluß von Glucose auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

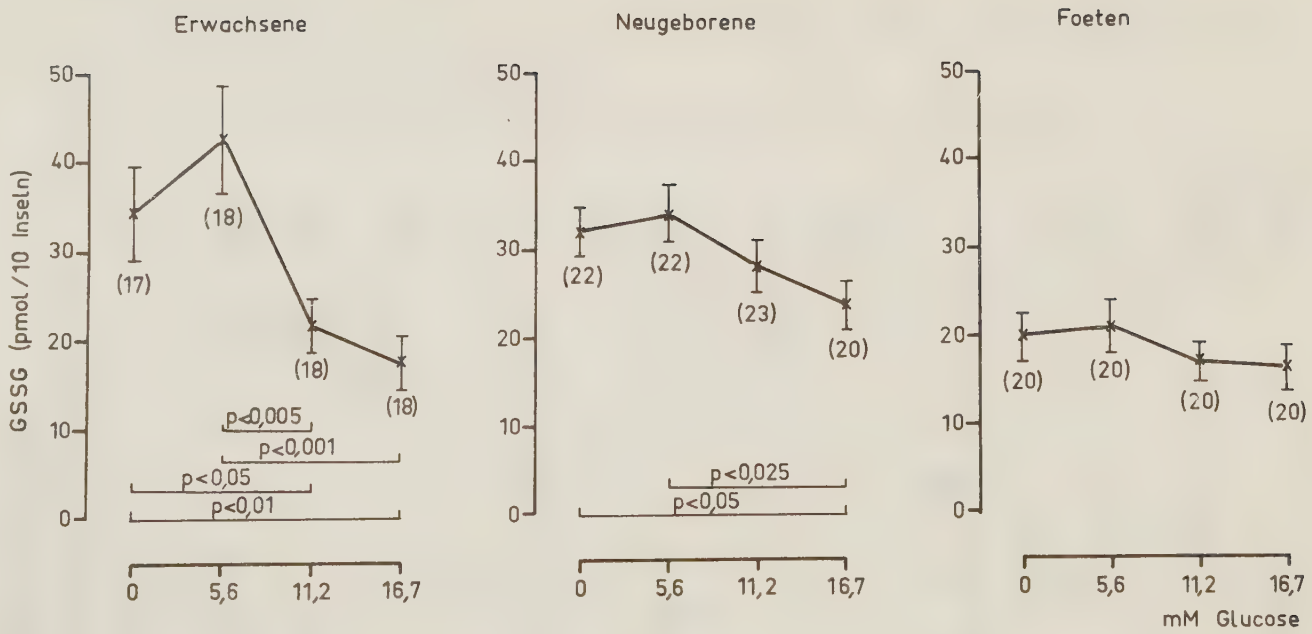


Abb. 15

Einfluß von Glucose auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert

Mittelwerte ± SEM

Anzahl der Versuche in Klammern

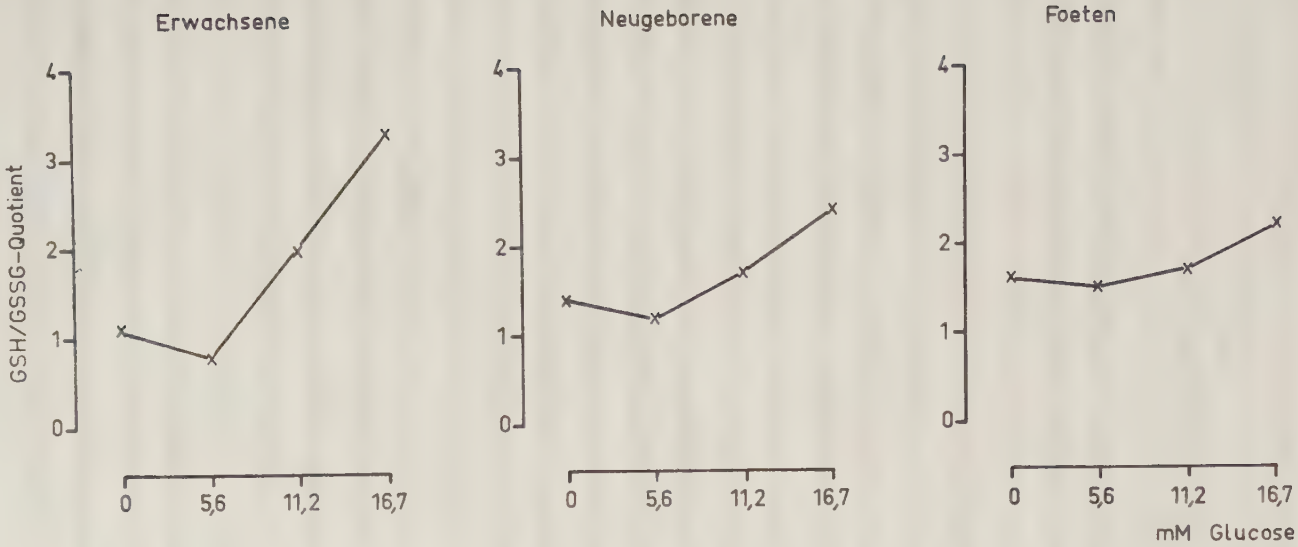


Abb. 16

Einfluß von Glucose auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tab. 16 und 17 entnommen

5. DISKUSSION

5.1. Einfluß der Inkubationszeit

Für die rasch einsetzende Insulinsekretion nach Glucosestimulation werden in der Literatur zwei Möglichkeiten beschrieben.
Die erste Theorie wird hauptsächlich von Matschinsky et al. (25) vertreten, der annimmt, daß Glucose selbst als Signal wirkt und mit einem stereospezifischen Glucoserezeptor, der auf der Membran der ß-Zelle lokalisiert ist, reagiert. Als Signal für die Insulinsekretion kommt auch, das ist die zweite Theorie, ein Metabolit der Glucose, oder ein durch den Glucosemetabolismus gebildeter Kofaktor in Frage. Wenn die Wirkung der Glucose auf die Insulinsekretion aber durch Änderungen der Konzentration eines oder mehrerer Metaboliten zustande kommen soll, so müssen diese Änderungen nach Glucosezusatz früher oder mindestens ebenso schnell auftreten wie die Insulinsekretion. Auch dürfte feststehen, daß nicht nur ein Metabolit für die Auslösung der Insulinsekretion in Frage kommt, denn α-KIC, das keinen gemeinsamen Metaboliten mit Glucose besitzt, stimuliert die Insulinsekretion genauso gut wie Glucose (132).

Bei in vivo-Untersuchungen hyperglycämischer ob/ob-Mäuse wurde bereits 1,5 Minuten nach Glucosegabe von Matschinsky und Ellerman ein Anstieg der G-6-P-Konzentration gemessen (133). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte aber später an Ratten-

inseln keine Änderung von G-6-P und 6-PG innerhalb von 5 Minuten nach Glucosegabe feststellen (25). Ashcroft et al. (134) zeigten 1973, daß sowohl bei Mäuse- als auch bei Ratteninseln G-6-P nach Erhöhung der extrazellulären Glucosekonzentration rasch ansteigt: bei Mäuseinseln wurde die Zunahme innerhalb von zwei Minuten beobachtet, bei Ratteninseln nach fünf Minuten. Fructose-1,6-PP und Triosephosphate waren bei Mäuseinseln bereits nach zwei Minuten erhöht, dagegen nicht nach 5-minütiger Inkubation bei Ratteninseln. Diese metabolischen Differenzen dürften auf Speziesunterschiede zurückzuführen sein.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen Resultate von Panten et al. (93), der bei ob/ob-Mäusen innerhalb von 20 Sekunden nach Glucosegabe eine Fluoreszenzzunahme reduzierter Pyridinnukleotide feststellte. Seine Messungen erfaßten allerdings den Gesamtgehalt an Pyridinnukleotiden, sodaß eine Unterscheidung zwischen NADH und NADPH nicht möglich war. Trus et al. (95) stellten nach 30 Sekunden einen Anstieg der Insulinsekretion, des G-6-P-Gehaltes und eine geringe Zunahme an NADH fest, die aber erst nach einer Minute signifikant war. Aufgrund dieser Verzögerung und der Tatsache, daß die Insulinsekretion bereits nach 30 Sekunden angelaufen ist (95), schreiben die Autoren dem NADH keine Mediatorfunktion zu.
Von Malaisse und Mitarbeitern wurde der Einfluß des NAD(P)H-Systems auf die Insulinsekretion untersucht. Mit Menadion (135) und NH_4^+ (136) wurde eine Abnahme an NAD(P)H fest-

gestellt, die mit einer Abnahme des glucoseinduzierten $^{45}Ca^{2+}$-Effluxes und der Insulinsekretion einherging. Glycolyse, Laktat- und Pyruvat-Output und Adeninnukleotidkonzentration waren nicht beeinflußt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß eine Erhöhung der Glucosekonzentration zu einer Steigerung von NADH und den NADH/NAD- und NADPH/NADP-Quotienten führt (92). Wurde die Änderung der Pyridinnukleotide in Abhängigkeit von der Inkubationszeit verfolgt, so war bereits eine Minute nach Glucosegabe ein Anstieg zu erkennen. Nach drei Minuten erreichten der NADPH/NADP-Quotient und NADH ihr Maximum. Diese Untersuchungen wurden noch durch die Einführung einer 60-minütigen Vorinkubation zur Stabilisierung der Pyridinnukleotidkonzentration vor der Glucosestimulation verbessert. Nun konnte die Arbeitsgruppe einen biphasischen Verlauf der Pyridinnukleotidkonzentrationen feststellen. Die Konzentration an NADH und NADPH, die bei dieser Serie gemeinsam bestimmt wurde, nahm innerhalb einer Minute zu, ein Maximum war nach zwei Minuten festzustellen. Während der 3. - 6. Minute lagen die Werte signifikant niedriger. Nach der 6. Minute - zu dieser Zeit erreicht auch die Insulinsekretion nach dem ersten Peak ihren tiefsten Wert - erfolgte ein weiterer NAD(P)H-Anstieg. Auch Ammon et al. (59) stellten fest, daß der NADPH/NADP-Quotient nach Inkubation mit 2 mg/ml Glucose innerhalb einer Minute ansteigt.

Parallel zu den rasch auftretenden Änderungen einiger Metaboliten und Kofaktoren nach Glucosestimulation konnte bei

Untersuchungen in dieser Arbeit bereits nach einer Minute ein Anstieg von GSH bzw. eine Abnahme von GSSG gemessen werden. Nachdem Ammon et al. (74) nach Metylenblau, Diamid und t-BHP eine Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten und der Insulinsekretion festgestellt hatten, ist dieses Ergebnis - nämlich der rasche Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten - ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des GSH/GSSG-Systems bei der Freisetzung von Insulin.

Bekannt ist, daß die Insulinsekretion biphasisch verläuft und der erste Peak etwa 3-4 Minuten nach Glucosegabe auftritt, während die zweite Phase ab der 8. Minute anläuft (137). Man nimmt an, daß während der ersten Phase gespeichertes Insulin freigesetzt, in der zweiten neu synthetisiertes sezerniert wird (138). Diese Theorie wird dadurch untermauert, daß Puromycin, ein Hemmstoff der Proteinsynthese, nur die zweite Phase der Insulinsekretion hemmt (138). Da der GSH-Anstieg rasch eintritt, kann ein Einfluß auf die erste Phase der Insulinsekretion angenommen werden. Möglicherweise hat GSH aber auch einen Effekt auf die zweite Phase, denn bei Tolbutamid, das keinen Einfluß auf Glucoseutilisation (32) und Pyridinnukleotide in der ß-Zelle (139) hat, ist nur der frühe Peak der Insulinsekretion festzustellen. Der Einfluß des Glutathions auf die zweite Phase könnte über

1. einen gesteigerten Aminosäurentransport erfolgen und/ oder
2. eine gesteigerte Biosynthese.

Von beiden Vorgängen ist bekannt, daß sie durch den Redox-

Status des GSH/GSSG-Systems beeinflußt werden (13, 140) und die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten zur Aktivierung führt.

Da der Redoxstatus der ß-Zelle, sowohl der NADPH/NADP- (59), als auch der GSH/GSSG- Quotient (Abb. 3, Tab. 5) innerhalb einer Minute nach Glucosestimulation verändert wird und Änderungen der Kationenfluxe innerhalb von zwei Minuten festgestellt wurden (141), ist ein Einfluß von Glutathion bereits zum frühesten Zeitpunkt der Insulinsekretion wahrscheinlich. Über die Redoxsysteme wird möglicherweise die Verbindung zu Änderungen in den Ionenströmen durch Prozesse auf/in der Zellmembran hergestellt.

5.2. Glucose und exogenes Insulin

Von nahezu allen Hormonen wird neben einer Stimulation durch Releasing-Faktoren auch ein negativer Feedback-Mechanismus über Hypothalamus und Hypophyse beschrieben. Für die Sekretion von Insulin sind zwar Stimulatoren wie Glucose und Aminosäuren bekannt, es fehlen aber Hinweise auf ein Releasing-Hormon und einen Feedback über das hypothalamisch-hypophysäre System. Mehrere Befunde deuten darauf hin, daß die ß-Zelle s e l b s t gegenüber hohen Konzentrationen an Insulin einen Mechanismus zur Regulation besitzt.

Eine Reihe von Ergebnissen zeigt, daß exogenes Insulin die glucose-induzierte Insulinsekretion zu hemmen vermag (96-101, 142-151).
Weitere Arbeiten bekräftigen indirekt einen negativen Feedback von Insulin. Untersuchungen von Dunbar et al. (152) ergaben, daß die Insulinsekretion und die $^{14}CO_2$-Produktion einer einzelnen Insel mit steigender Inselzahl in einem konstanten Volumen abnimmt. Die Sekretionsleistung nimmt im Vergleich zum offenen Perifusionssystem ebenfalls ab, wenn ein geschlossenes Perifusionssystem vorliegt, d. h., das Volumen des Inkubationsmediums rezirkuliert, sodaß es zu einer Anreicherung endogenen Insulins kommt (152).

Hellman und Hellerström (153) stellten fest, daß durch Schütteln von Inseln im Inkubationsmedium mehr Insulin

sezerniert wird als bei Nichtschütteln. Diesen Befund erklärten sie mit einem gesteigerten Abtransport sezernierten Insulins von den Inseln. Weiterhin könnte eine nicht signifikant veränderte Insulinabgabe nach Reinkubation der Inseln, d. h. nach Auswaschen des im Medium enthaltenen Insulins, für einen Feedback-Mechanismus sprechen (154). Loreti und Mitarbeiter (155) fanden bei Perifusion von Inseln eine wesentlich höhere Insulinsekretion als bei Inkubation. Daraus folgerten sie, daß der Abtransport von Insulin die Insulinsekretion beeinflußt.

Andererseits liegen auch Arbeiten vor, die im Widerspruch zu den bisher genannten stehen. Shima et al. (156), Tanaka et al. (157), Sando et al. (158), Grodsky et al. (159) und Malaisse et al. (160) konnten keinen hemmenden Effekt exogenen Insulins auf die Insulinsekretion feststellen. Diese kontroversen Resultate können eventuell auf technische Probleme zurückgeführt werden. Endogenes Insulin wird im Radioimmunoassay (RIA) zusammen mit exogen zugesetztem Insulin erfaßt, weshalb eine Unterscheidung von beiden nicht möglich ist. In Gegenwart hoher Konzentrationen exogenen Insulins wäre es daher denkbar, daß minimale Änderungen der Insulinsekretion nicht exakt bestimmt werden können. Um dieses Problem zu umgehen wurden
1. für die Untersuchungen Fischinsuline eingesetzt. Ohgawara et al. (151, 161) und Sando et al. (158) benutzten Bonito-Insulin, Grodsky (159) ein anderes Fisch-Insulin. Diese gehen keine Kreuzreaktion mit Insulin-Antikörpern

des RIA ein. Unterschiedliche Ergebnisse zu Perfusionsversuchen mit üblichen Insulinen lassen jedoch vermuten, daß Fischinsuline, die sich durch 17-19 Aminosäuren von Humaninsulin unterscheiden (162), aufgrund ihrer starken Sequenzabweichung gegenüber Ratteninsulin, keinen Einfluß auf die ß-Zelle haben.

2. Messungen von ^{3}H-Insulin vorgenommen, das nach zweistündiger Inkubation mit ^{3}H-Leucin gebildet worden war (163). Bei diesen Versuchen konnte weder mit 200 µE/ml Ratteninsulin noch mit 200 µE/ml Schweineinsulin eine Hemmung der Insulinsekretion festgestellt werden. 2,5 mE/ml Schweineinsulin bewirkten eine Abnahme der absoluten Rate markierten Insulins, was die Autoren durch einen gesteigerten Hormonabbau in Inseln erklärten.

3. zur Unterscheidung zwischen exogenem und endogenem Insulin C-Peptidmessungen durchgeführt. C-Peptid und Insulin werden von der ß-Zelle im äquimolaren Verhältnis abgegeben (156). C-Peptid stellt daher einen Index der Insulinsekretion dar. Die Bestimmung von endogen sezerniertem Insulin in Form des C-Peptids kann neben exogen zugesetztem Insulin bei in vivo-Untersuchungen störungsfrei durchgeführt werden, Die Bestimmung hat ferner den Vorteil, daß mehr C-Peptid in die systemische Zirkulation tritt als Insulin, da es in der Leber bei der initialen Passage weniger stark abgebaut wird, eine etwa 6-fach längere Halbwertszeit hat und deshalb Schwankungen im C-Peptidspiegel exakter bestimmbar sind als von Insulin. Allerdings wurden auch mit dieser Methode keine einheit-

lichen Ergebnisse erzielt. Shima et al. (156) beobachteten nach intravenöser Gabe von Schweineinsulin beim Menschen keine Abnahme der C-Peptid-Konzentration. Tanaka et al. (157) stellten bei Perfusionsversuchen an Ratten ebenfalls keine Abnahme der C-Peptid-Sekretion nach Zusatz von Rateninsulin fest. Dagegen berichteten Beischer und Mitarbeiter (164) von einer Sekretionshemmung bei Insulin-Plasmakonzentrationen von 50 µE/ml. Diese unterschiedlichen Resultate können auf Schwankungen des Glucosespiegels zurückgeführt werden, obwohl versucht wurde, durch Glucoseinfusion eine Glucosehomöostase während der Versuche zu erzielen.

Vergleichende Untersuchungen zwischen hypoglycämischem und euglycämischem Zustand wurden von Service und Mitarbeitern vorgenommen (97). Unter Einhaltung eines konstanten Plasmaglucosespiegels, der nur minimalen Schwankungen unterlag, fand diese Arbeitsgruppe nach Insulinzufuhr eine Hemmung der C-Peptid-Konzentration im Blut, die allerdings nur etwa 1/3 der Hemmung im hypoglycämischen Zustand betrug.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, daß die Mehrzahl der Autoren trotz unterschiedlicher Methoden eine Hemmung der Insulinsekretion feststellten, kann ein Feedback-Mechanismus der Insulinsekretion angenommen werden. Bei in vivo-Untersuchungen muß außerdem neben Schwankungen des Glucosespiegels berücksichtigt werden, daß auch andere Substrate außer Glucose die Insulinsekretion beeinflussen können.

Als weitere Erklärung für die widersprüchlichen Befunde ist eine Selbsthemmung bei hohen Glucosekonzentrationen zu sehen. Die durch Glucosé induzierte Insulinsekretion kann selbst eine starke Hemmung bewirken, sodaß exogen zugesetztes Insulin keine weitere Abnahme hervorrufen kann.

Unterschiede in den Befunden dürften auch bei den verwendeten Insulinkonzentrationen zu suchen sein. Loreti et al. (155) finden im statischen System bei isolierten Mäuseinseln mit 250 µE/ml Ratteninsulin im Inkubationsmedium eine Hemmung. Iversen et al. (100) bei Perfusionsversuchen am Kaninchenpankreas mit 180-420 µE/ml, Loubatières et al. (147) mußten dagegen Konzentrationen von 2 mE/ml Insulin einsetzen, um am perfundierten Pankreas eine Hemmung zu sehen.

Aus Untersuchungen von Hedeskov und Capito (165), Snyder et al. (166) und Untersuchungen unseres Labors (117) geht hervor, daß sich in Gegenwart von 16,7 mM Glucose bis zu 10 000 µE Insulin/ml, bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose 1 300 µE/ml im Inkubationsmedium ansammeln können, wenn 10 Inseln 180 Minuten in 0,15 ml Medium inkubiert werden. Nach Reduktion der Inselzahl auf 5, der Inkubationszeit auf 90 Minuten und Vergrößerung des Inkubationsmediums auf 1 ml wurden noch 110 µE/ml Insulin bei 5,6 mM Glucose und bei 11,1 mM 890 µE/ml im Vergleich zu 6 600 µE/ml unter den vorher genannten Bedingungen gemessen.

Zawalich (167) setzte zu Perfusionsstudien an isolierten Inseln 1 µg/ml (20-25 mE/ml) Schweineinsulin ein und begründete diese hohe Konzentration damit, daß bei maximaler

Stimulation der Insulinspiegel im Zentrum der Insel mehr als 1 µg/ml betragen müßte.

Aufgrund dieser Überlegungen kann davon ausgegangen werden, daß in vivo die Insulinkonzentration in direkter Umgebung der Insel in der Größenordnung liegt, die bei dieser Arbeit an exogenem Insulin zugesetzt wurde und daß somit mit physiologischen und nicht mit pharmakologischen Dosen gearbeitet wurde.

In isolierten Langerhansschen Inseln wurde nach Inkubation mit exogenem Insulin eine Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten (67), des NADPH/NADP-Quotienten und der PPS-Aktivität (66) gemessen. Parallel zu diesen metabolischen Veränderungen wurde unter Einfluß exogenen Insulins die durch Glucose induzierte Insulinsekretion vermindert (66).

Die Ergebnisse dieser Arbeit (Tab. 7, Abb. 4) zeigen, daß auch der GSH-Gehalt unter Einwirkung von exogenem Insulin abnimmt. Während in Gegenwart von 16,7 mM Glucose GSH dosisabhängig verringert wird, zeigt sich bei 5,6 mM Glucose schon mit 200 µE/ml exogenen Insulins eine maximale Erniedrigung des GSH-Gehaltes.
Von der Insulinsekretion ist bekannt, daß bereits 5,6 mM Glucose zu einer geringen Stimulation führen und die Insulinsekretion in Gegenwart von 16,7 mM Glucose stark erhöht wird (57). Entsprechend verhält sich der GSH-Gehalt in Inseln: bei 16,7 mM Glucose liegt er höher als bei 5,6 mM. Hemmung mit exogenem Insulin führt bei beiden Glucose-

konzentrationen zum gleichen GSH-Gehalt. Bei 5,6 mM Glucose wird allerdings aufgrund des niedrigeren Ausgangswertes an GSH der Basalwert bereits mit 200 µE/ml exogenen Insulins erreicht. Eine Hemmung unter den Basalwert ist auch mit höheren Dosen exogenen Insulins nicht möglich. Bei Anwesenheit von 16,7 mM Glucose haben dagegen erst 800 µE/ml denselben Hemmeffekt, da der GSH-Spiegel bei dieser Glucose-Konzentration im Vergleich zu 5,6 mM erhöht ist und niedrigere Dosen exogenen Insulins diesen höheren GSH-Gehalt nicht auf den Basalwert reduzieren können.

Bei Untersuchung des GSSG-Gehaltes in Langerhansschen Inseln traten widersprüchliche Resultate auf: bei Anwesenheit von 16,7 mM Glucose nimmt GSSG nach Zugabe von exogenem Insulin zu, bei 5,6 mM ab. Betrachtet man jedoch den GSH/GSSG-Quotienten, ist zu erkennen, daß er durch Insulinzusatz bei 5,6 mM Glucose nicht verändert wird. Möglicherweise darf ein bestimmtes Verhältnis GSH:GSSG nicht unterschritten werden, damit die Zellfunktionen aufrecht erhalten werden können. Durch Abgabe von GSSG ins Medium, was auch von anderen Geweben beschrieben wurde (168) oder durch Reaktion von GSSG mit Protein-SH könnte dieses Gleichgewicht hergestellt werden. Eine Bestätigung dieser Vermutung ist möglicherweise die Abnahme des Gesamtglutathiongehaltes bei 5,6 mM Glucose. Dagegen wird Gesamtglutathion in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose durch exogenes Insulin nicht verändert.

Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese von Toyota et al. (169), die annahmen, daß exogenes Insulin und C-Peptid auf die Zellmembran und über den intrazellulären Glucosemetabolismus wirken und dadurch die erste und zweite Phase der Insulinsekretion hemmen.

Eine Bindung von Insulin an Insulinrezeptoren der Langerhansschen Insel konnte nachgewiesen werden (170). Dabei wurde festgestellt, daß die Dissoziationskonstante der Insulinbindung den ED_{50}-Werten verschiedener Insulinwirkungen ähnlich ist, d. h. die Insulinbindung korreliert mit der Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion, der Erniedrigung der glucosestimulierten PPS-Aktivität und der Erniedrigung des durch Glucose erhöhten NADPH/NADP-Quotienten.

Weitere Untersuchungen unseres Labors haben gezeigt, daß die durch Glucose induzierte Ca^{2+}-Aufnahme durch exogenes Insulin (171) und Thioloxidantien wie Diamid und Methylenblau (172) gehemmt wird. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß für die Ca^{2+}-Aufnahme der Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems von Bedeutung ist.

Faßt man alle Befunde über den Einfluß von exogenem Insulin auf den Metabolismus der Langerhansschen Insel zusammen, so ergibt sich folgender hypothetischer Mechanismus zur Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch exogenes Insulin: Exogenes Insulin führt nach Bindung an Insulinrezeptoren der ß-Zelle, vermutlich auf der Stufe der G-6-P-Dehydrogenase, zur Hemmung des PPS und damit zu einer verminderten Bildung von NADPH und zur Abnahme des NADPH/NADP-

Quotienten. Da der GSH/GSSG-Quotient vom NADPH/NADP-Quotienten abhängig ist, nimmt auch der Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems ab. Möglicherweise ist auch die Calciumaufnahme - zumindest teilweise - vom Redoxstatus des GSH/GSSG-Quotienten abhängig. Eine Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten könnte dann über eine verminderte Calciumaufnahme zur Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führen.

5.3.1. Leucin

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, daß die Aminosäure Leucin einen stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion ausübt (102-105, 173). Unklar ist allerdings, ob Leucin die Anwesenheit von Glucose benötigt, um seine Insulin-freisetzende Wirkung zu entfalten. Einerseits wurde eine Insulinsekretion nach Leucin in Abwesenheit von Glucose beobachtet (106,107), andererseits von verschiedener Seite festgestellt, daß Leucin die insulinotrope Wirkung von Glucose steigert (104, 106-108).
Bei Perfusion des isolierten Rattenpankreas wurde in Gegenwart von Glucose (3 mg/ml) eine höhere Insulinsekretion beobachtet als mit Leucin oder Glucose allein (106). Andere Autoren wiesen aber auch auf sich gegenseitig hemmende Einflüsse von Leucin und Glucose hin. In Gegenwart substimulatorischer Glucosemengen war Leucin (10 mM) hinsichtlich seines insulinotropen Effektes wirksamer als bei höheren Glucosekonzentrationen (108). Panten et al. (109) beobachteten bei Abwesenheit von Glucose nach Leucin eine höhere Insulinsekretion als in Kombination mit Glucose.
Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise Glucose - sofern sie für die Insulinsekretion des Leucins von Bedeutung ist - sich am Sekretionsprozeß von Leucin beteiligt. Folgende Möglichkeiten kommen in Frage:
1. Für die Sekretion von Leucin sind Metaboliten der Glucose nötig

2. Leucin stellt selbst oder aus dem Stoffwechsel der Glucose Metaboliten oder Kofaktoren zur Verfügung, die die Insulinfreisetzung der Glucose verstärken.
3. Die insulinotrope Wirkung von Leucin wird durch seine eigenen Stoffwechselprodukte oder die der Glucose erhöht.

Geht man davon aus, daß Leucin selbst zur Insulinsekretion führt, kommt die Interaktion mit einem Rezeptor in Frage. Die Rezeptorhypothese wird dadurch gestützt, daß 2-Amino-bicyclo-(2,2,1)heptan-2-carbonsäure (b(-)-BCH), ein synthetisches, nicht metabolisierbares Leucinanalogon, zur Insulinsekretion führt.
b(-)-BCH wird über dasselbe Transportsystem, das L-System, aufgenommen wie L-Leucin. Dieses L-System wird als Trigger für die Insulinsekretion angesehen (174). Hellman et al. (175) stellten allerdings fest, daß auch D-Leucin über dieses System aufgenommen wird, das aber nicht zur Sekretion führt. Aufgrund dieses Befundes vermuteten sie, daß die Rezeptorstelle, die den Transport von Leucin bewirkt, nicht mit der identisch ist, die das Signal zur Insulinsekretion gibt.

Weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Leucins zeigten, daß Leucin in der ß-Zelle verstoffwechselt wird (112). Leucinmetaboliten wie α-KIC (113), Acetoacetat (176) und Hydroxybutyrat (108) stimulieren die Insulinsekretion und lassen vermuten, daß der Metabolismus des Leucins in der ß-Zelle für die Insulinfreisetzung von Bedeutung ist.

Hellmann et al. (112) stellten fest, daß Glucose die Leucinoxidation dosisabhängig hemmt und sie folgerten, daß die Hemmung der Leucinoxidation durch den Glucosemetabolismus hervorgerufen wird. Diese Vermutung wurde auch dadurch bekräftigt, daß Mannoheptulose, ein Hemmstoff der Glucosephosphorylierung, den hemmenden Effekt der Glucose auf die Leucinoxidation verhindert.
Parallel dazu verlief bei hohen Glucosekonzentrationen eine Hemmung der durch Leucin induzierten Insulinsekretion (108). Leucin 10 mM steigerte die Insulinsekretion in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose stärker als bei 1,5 oder 3 mg/ml Glucose. Dieser hemmende Effekt der Glucose wurde durch Zusatz von Mannoheptulose aufgehoben (108, 112). Die durch Leucin stimulierte Insulinsekretion ohne Glucose wurde aber durch Mannoheptulose nicht blockiert (177).
Weitere Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung der Stoffwechselwege von Leucin und Glucose erhielten Gylfe und Sehlin (115). Bei Anwesenheit von 5 mM Glucose bewirkten 5 oder 20 mM Leucin eine Abnahme des Asparaginsäuregehaltes, während 5 mM Leucin und 20 mM Glucose den Asparagin- und γ-Aminobuttersäuregehalt von Inseln im Vergleich zu Leucin-inkubierten Inseln erhöhten. Auch b(-)-BCH verminderte den Asparaginsäurespiegel der ß-Zelle (178). Da aber andererseits b(+)-BCH, das keine Insulinsekretion hervorruft, auch zu einer Verminderung von Asparaginsäure führte, ist es unwahrscheinlich, daß die Insulinsekretion über diese Aminosäure reguliert wird.

L-Leucin hat keinen Einfluß auf die Glycolyse, was durch Messungen der $^{3}H_2O$-Produktion festgestellt wurde, stimuliert aber die Produktion von $^{14}CO_2$ aus D- (U-^{14}C)-Glucose (115). Ähnliches wurde bei b(-)-BCH, nicht aber bei b(+)-BCH, beobachtet (178).

Obwohl die oben erwähnten Hinweise vorliegen, daß sich die Abbauwege von Glucose und Leucin gegenseitig beeinflussen, gibt es andererseits auch Untersuchungen, die zeigen, daß sich der Aufnahmemechanismus des Leucins von dem der Glucose unterscheidet und Konzentrationsänderungen von Metaboliten der Glucose durch Leucin nicht zu sehen sind.
Mannoheptulose führte zu keiner Hemmung der Leucinoxidation und deshalb vermutlich auch zu keiner Störung in der Leucin-Aufnahme (112). Dies deutet darauf hin, daß die Aufnahme von Glucose und Leucin nicht über den gleichen Mechanismus erfolgt.

Mit steigender Glucosekonzentration wurde als Folge einer erhöhten Aktivität des PPS eine Zunahme von 6-PG festgestellt (67, 179). Nach Inkubation mit Glucose plus Leucin konnte keine signifikante Änderung von 6-PG beobachtet werden (58).
Weitere Untersuchungen unseres Labors ergaben, daß nach Leucin die Bildung von $^{14}CO_2$ und THO aus 1-^{14}C und 6-^{14}C sowie 5-^{3}H-Glucose nicht verändert war (180). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Leucin keine Wirkung auf den PPS hat. Bei Hemmung des PPS durch 6-AN wurde die durch Leucin induzierte Insulinsekretion nicht beeinflußt (181).

Befunde von Malaisse (116) zeigen, daß der NADPH/NADP-Quotient durch Leucin bei Abwesenheit von Glucose nicht verändert wird.

Andererseits war aber der NADPH-Gehalt, dessen wichtigste Quelle der PPS darstellt, nach 10mM Leucin in Gegenwart von 2 mg/ml Glucose signifikant erhöht (59). Möglicherweise führt Leucin auf andere Weise zur Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten als durch Steigerung der PPS-Aktivität. Denkbar wäre eine Übertragung des Wasserstoffs von NADH auf NADP mit Hilfe von Transhydrogenasen. Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, daß eine Zunahme von NADH nach Inkubation mit Leucin (116) und Leucin plus Glucose (59) beobachtet wurde. Dieser durch Leucin hervorgerufene NADH-Anstieg erfolgt durch den Abbau von Leucin, allerdings nicht über die Glycolyse, denn diesen Stoffwechselweg beeinflußt Leucin im Gegensatz zu Glucose nicht (115). Möglicherweise wird durch Leucin der NADH-Gehalt durch Stimulation der mitochondrialen Glutamat-Dehydrogenase in Inseln erhöht (182).

Panten , der einen raschen Anstieg reduzierter Pyridinnukleotide nach L-Leucin feststellte, glaubt, daß dieser Anstieg v.a. durch Produktion von NADH in den Mitochondrien unter Einwirkung der α-KIC-Dehydrogenase zustande kommt, denn nach Acetoacetat und β-Hydroxybutyrat war keine Fluoreszenzänderung zu beobachten (113). In Frage gestellt sind diese Ergebnisse dadurch, daß auch das nicht metabolisierbare b-BCH zu einem Fluoreszenzanstieg führt (183) und möglicherweise die Fluoreszenzänderung durch Reaktion von Leucin mit seinem Rezeptor

hervorgerufen wird.Daß aber auch NADPH, selbst wenn es über NADH bereitgestellt wird, für die Insulinsekretion von Bedeutung ist, ergibt sich aus der Tatsache, daß Methylenblau den durch Glucose plus Leucin stimulierten NADPH/NADP-Quotienten (59) und die Insulinsekretion (59) hemmt, nicht aber den NADH/NAD-Quotienten (58).

Vergleicht man nun die Ergebnisse, die unter dem Einfluß von Leucin auf den NADPH- und GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln gemessen wurden, so ergeben sich Parallelen.
Bei Abwesenheit von Glucose führt Leucin, wie die Ergebnisse von Malaisse (116) zeigen, zu keinem Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten. In dieser Arbeit wurde nun festgestellt, daß auch der GSH/GSSG-Quotient durch Leucin allein nicht verändert wird (Tab.11,Abb.7). Setzt man dem Inkubationsmedium aber Leucin plus 5,6 mM Glucose zu, so nehmen im Vergleich zu Glucose allein sowohl der NADPH-(58) als auch der GSH-Gehalt der Insel zu, der NADP- und GSSG-Gehalt entsprechend ab. Diese Resultate lassen erkennen, daß
1) die Wirkung von Leucin auf die Insulinsekretion zumindest teilweise über eine Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten zustande kommt, der seinerseits vom Redoxstatus des NADPH/NADP-Quotienten abhängig ist, denn weder Glucose noch Leucin allein führen zu einer Erhöhung des GSH/GSSG-Quotienten.
2) Leucin, um eine Wirkung auf NADPH und GSH zu zeigen, die Anwesenheit von Glucose benötigt.
Die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln ist nach Inkubation mit 10 mM Leucin ohne Glucose im Vergleich

zum Pufferwert erhöht (Abb.10,Tab.13). Dies zeigt, daß Leucin für seinen stimulatorischen Effekt keine Glucose benötigt und die Insulinsekretion nicht allein über das Glutathionssystem erfolgt. Die mäßig hohe Sekretionsrate nach Leucin wird durch Anwesenheit von 5,6 mM Glucose deutlich gesteigert. Diese letzteren Befunde zeigen, daß über eine Änderung des NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Quotienten die durch Leucin induzierte Insulinsekretion moduliert wird. Auch die Thioloxidantien Diamid und t-BHP, die den GSH/GSSG-Quotienten herabsetzen, führten zu einer Hemmung der Leucin-induzierten Insulinsekretion.
Auf die Potenzierung der Leucinwirkung durch Glucose in einer Konzentration, bei der sie selbst noch keine Insulinsekretion bewirkt, soll hier eingegangen werden. Denkbar ist, daß
1. Glucose die Affinität für einen Leucinrezeptor durch Konformationsänderung der Zellmembran verändert
2. über den Metabolismus der Glucose ein Stoffwechselprodukt entsteht - das die Leucinwirkung möglicherweise unter Beteiligung von GSH - verstärkt.

5.3.2 Leucin und exogenes Insulin

Exogenes Insulin hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion (66) und den PPS (66), vermindert den NADPH/NADP-Quotienten (66) und wie in dieser Arbeit festgestellt wurde auch den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln (s. 4.2).
Wie die bisherigen Befunde zeigen, kann die durch Leucin induzierte Insulinsekretion zwar nicht direkt im Zusammen-

hang mit dem PPS stehen, sie wird aber durch ein Stoffwechselprodukt des PPS, das NADPH, beeinflußt. Die Insulinfreisetzung, hervorgerufen durch 10 mM Leucin und 5,6 mM Glucose, wird durch exogenes Insulin bereits mit 200µE/ml gehemmt (117).
Wie in 4.2. dargelegt, führt exogenes Insulin bei Anwesenheit von 5,6 mM Glucose alleine bereits zu einer Abnahme von GSH. Wie Tab. 14 zeigt, wird der GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln in Gegenwart von 10 mM Leucin plus 5,6 mM Glucose durch exogenes Insulin ebenfalls vermindert. Vergleicht man die Abnahme von GSH in beiden Fällen, so zeigt sich, daß die Verminderung des insulären GSH-Gehaltes durch exogenes Insulin bei den Versuchen mit 5,6 mM Glucose ebenso groß ist, wie bei den Versuchen mit Glucose plus Leucin.
Es ist daher denkbar, daß die durch exogenes Insulin hervorgerufene Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten bei Anwesenheit von Leucin plus 5,6 mM Glucose im wesentlichen den Anteil der Glucose an diesem Quotienten betrifft, nicht aber den Anteil des Leucins.

5.4. Foeten, Neugeborene, Erwachsene

Bei Ratten und anderen Spezies sind hinsichtlich der Insulinsekretion Unterschiede zwischen Foeten, Neugeborenen und Erwachsenen festzustellen. Während bei erwachsenen Tieren nach Glucosestimulation eine Insulinsekretion auftritt, sehen zahlreiche Arbeitsgruppen bei Foeten und Neugeborenen kurz nach der Geburt keine Insulinantwort (118-120). Möglicherweise sind Unterschiede im Ablauf des Glucose-

stoffwechsels der ß-Zelle die Ursache für die unterschiedliche Insulinantwort der Inseln auf einen Glucosereiz hin.

Agren et al. (184) konnten bei Ratten wenige Stunden nach der Geburt keine Stimulation der Insulinfreisetzung durch 16,7 mM Glucose beobachten. Inkubierten sie jedoch mit Glycerinaldehyd, so zeigte sich eine höhere Insulinsekretion. Die fehlende Insulinantwort bei einen Tag alten Neugeborenen erklärten sie mit einem noch nicht voll funktionierenden Glucose-Abbaumechanismus oberhalb der Bildung von Triosephosphat. Denkbar ist, daß die ß-Zelle von Foeten und Neugeborenen das Glucosemolekül nicht als Stimulus für die Insulinsekretion erkennt oder ein hypothetischer Rezeptor bereits bei niedrigen Glucosekonzentrationen gesättigt ist.
In diesem Zusammenhang kann auch die Glucosephosphorylierung von Bedeutung sein, denn es wurde festgestellt, daß sie zunimmt, sobald auch die Insulinsekretion einsetzt (185). Außerdem geht die Sensibilisierung gegenüber Glucose mit dem Auftreten einer high-K_M-Hexokinase in der Langerhansschen Insel einher (186). Asplund und Hellerström (187) folgerten allerdings aufgrund metabolischer Untersuchungen, daß die fehlende Stimulation direkt nach der Geburt nicht auf Defekten der Aufnahme, Phosphorylierung oder Oxidation der Glucose beruht, sondern daß auch andere Stoffwechselwege, wie z.B. der PPS, beteiligt sein können.

Von foetalen Inseln ist bekannt, daß sie Glucose über die Glycolyse, nicht aber über den PPS abbauen können. Messungen von Heinze und Steinke (50) zeigen, daß die C-1-Oxidation bei Foeten vermindert ist und erst zwei Tage nach der Geburt einsetzt. Fünf Tage post partum entspricht sie der Glucoseoxidation erwachsener Tiere. Diese Resultate konnten von Ammon und Düppenbecker (188) bestätigt werden. Während foetale Ratteninseln in Gegenwart von 16,7 mM Glucose einen geringen Umsatz über den PPS aufweisen, wird bei fünf Tage alten Neugeborenen eine Zunahme der Glucoseoxidation über den PPS beobachtet, die bei erwachsenen Tieren noch weiter ansteigt.

Parallel dazu verläuft die Insulinsekretion: Inseln foetaler Ratten zeigen keine Insulinsekretion (50). Sie setzt ebenfalls zwei Tage nach der Geburt ein (119).
Nach Glucosegabe zeigt sich bei Inkubation von foetalen Ratteninseln keine (118,119), bei Perifusion eine geringe Insulinsekretion (189,190). Da die Inkubation keine Untersuchung der Dynamik der Insulinsekretion zuläßt, die Perfusion aber wegen der Kleinheit foetaler Organe nicht durchgeführt werden kann, nahm Asplund (189) Perifusionen vor, um ein genaues Sekretionsmuster von Foeten und Neugeborenen zu erhalten. Erhöhung der Glucosekonzentration im Perifusionsmedium von 0,4 auf 3mg/ml führte bei 21,5 Tage alten Rattenfoeten zu einem schwachen ersten Peak der Insulinsekretion. Bei einen Tag alten Neugeborenen war dagegen schon ein leichter Anstieg der Insulinsekretion in der

zweiten Phase zu sehen. Bei 6 Tage alten Tieren wurde ein deutlicher Anstieg der Insulinsekretion in der ersten Phase beobachtet. Die Sekretion lag während stimulatorischer Glucosezufuhr auch während der zweiten Phase signifikant höher und zeigte einen biphasischen Verlauf.
Die Ergebnisse zeigen, daß bei Rattenfoeten der Mechanismus für die erste Phase der glucoseinduzierten Insulinsekretion zwar vorhanden, aber noch nicht vollständig ausgebildet ist, während die Entwicklung der zweiten Phase wohl erst im postnatalen Alter erfolgt.
Ähnliche Ergebnisse wie Asplund (189) erhielten Burr et al. (190) 1971 bei Untersuchungen zur Dynamik der Insulinsekretion an foetalen Rattenpankreaskulturen. 16,4 mM Glucose im Perifusionsmedium lösten den ersten Peak aus, der bei substimulatorischen Konzentrationen (2,4 mM) nicht zu sehen war, die zweite Phase lag aber wesenlich tiefer als bei erwachsenen Tieren mit demselben Stimulus.
Auch Befunde von Kervran und Randon (191) deuten darauf hin, daß schon zum Zeitpunkt der Geburt ein Sekretionsprofil vorliegt, das dem von erwachsenen Tieren entspricht und sich nur quantitativ unterscheidet. Im Vergleich zu 17,5 Tage alten perifundierten foetalen Pankreasstücken, bei denen nur eine schwache Insulinsekretion während der ersten 10 Minuten auftrat, bildet sich bis zum 21,5. Tag ein typisches biphasisches Sekretionsprofil.
Bei 19,5 Tage alten Foeten entsprach die Sekretionsrate auf Glucose in der frühen Phase der Erwachsener.

Daraus kann man schließen, daß bei Foeten zum Zeitpunkt der Geburt der Mechanismus, der zur Insulinsekretion führt und auf Glucose anspricht, bereits vorhanden ist und sich quantitativ, aber nicht qualitativ von dem Erwachsener unterscheidet.

Die geringe Ansprechbarkeit der foetalen β- Zelle gegenüber der erwachsener Tiere auf Glucose als insulinogenem Stimulus ist nicht in der unvollkommenen Entwicklung und Speicherung von Insulin zu suchen. Freie et al. (192) beobachteten, daß der Prozentsatz an Inselgewebe während der letzten vier Tage der Tragzeit zunimmt und bei 20 Tage alten Foeten den Wert Erwachsener erreicht. Der prozentuale β-Zellanteil ist bei Foeten kurz vor der Geburt am größten, nimmt nach der Geburt signifikant ab und erreicht bei Erwachsenen wieder einen höheren Wert (192). Vom 19.-22. Tag der Tragzeit nimmt auch die β-Zellgranulation zu und erreicht am 21. und 22. Tag den Wert Erwachsener (192). Zu diesem Zeitpunkt nimmt auch die Insulinkonzentration in der Insel zu (120,192).
Diese Beobachtungen zeigen, daß die qualitative Reifung der Pankreasinsel hinsichtlich Produktion und Speicherung von Insulin am letzten Tag der Tragzeit abgeschlossen ist.

Auch Proinsulin und Glucagon werden neben Insulin in der β-bzw. α - Zelle während der intrauterinen Entwicklung gebildet. Insulin und Glucagon konnten bereits bei 11 Tage alten Foeten im Pankreas elektronenmikroskopisch nachgewiesen

werden (193), im Blutkreislauf nach dem 17. intrauterinen Tag. Möglicherweise zirkulieren die Hormone schon vorher im Blut und ist ein Nachweis wegen technischer Schwierigkeiten nicht möglich.

Auch der Mechanismus der durch Glucose stimulierbaren Proinsulin- und Insulinbiosynthese ist in der foetalen Phase schon ausgebildet (194, 195). Heinze et al. (195) beobachteten, daß bei 21 Tage alten Rattenfoeten mit 1 mg/ml Glucose eine Stimulation der (Pro-)Insulinbiosynthese erfolgt und 3 mg/ml keine weitere Wirkung haben. Dagegen wird bei 5 und 10 Tage alten Neugeborenen die H^3-L-Leucinaufnahme in (Pro-) Insulin dosisabhängig und stärker stimuliert als bei Foeten. Diese Resultate stimmen mit denen von Asplund überein, der ebenfalls eine Stimulation der (Pro-)Insulinbiosynthese durch Glucose bei Foeten und Neugeborenen nachgewiesen hatte (194). Er stellte bei Foeten eine höhere Biosyntheserate fest als bei Neugeborenen. Diese Befunde zeigen, daß bei Foeten der Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinbiosynthese vor der glucoseinduzierten Insulinsekretion einsetzt.

Eine Insulinsekretion, die der Erwachsener ähnlich ist, wurde bei Foeten mit Phosphodiesterasehemmstoffen beobachtet (118, 190) und man vermutete, daß das noch nicht vollkommen entwickelte c-AMP-System bei der Insulinsekretion eine Rolle spielt. Heinze und Steinke (118) inkubierten mit Theophyllin und beobachteten eine Stimulation der Insu-

linsekretion in allen untersuchten Altersgruppen - 21 Tage alten Foeten, 5 Tage alten Neugeborenen und Erwachsenen. Während 16,5 mM Glucose nur bei Neugeborenen und Erwachsenen zur Sekretion führten, zeigte sich in Kombination mit 1 oder 10 mM Theophyllin auch bei Foeten eine signifikante Insulinfreisetzung. Die Insulinsekretion lag jedoch mit 67 bzw. 90 µE/ml bei foetalen Inseln nach Inkubation mit Glucose und Theophyllin um etwa eine Zehnerpotenz niedriger als bei Inseln von neugeborenen und erwachsenen Ratten. Taniguchi et al. (196) untersuchten neben dem Einfluß von Theophyllin auf die Insulinsekretion einen Tag alter Neugeborener auch den von Adenosin und stellten fest, daß 10 mM Adenosin und 16,7 mM Glucose bei Neugeborenen und Erwachsenen dieselbe Insulinantwort hervorrufen.

Kervran et al. berichten (191), daß Theophyllin die Glucosewirkung auf die Insulinsekretion bei 18,5 - 21,5 Tage alten Foeten um 65 % steigert, was mit Beobachtungen an erwachsenen Tieren in Einklang steht. Mit 5 mM Theophyllin und 13,9 mM Glucose erhielten sie eine Potenzierung der Insulinsekretion ab Tag 18,5 der Schwangerschaft. Aus diesen Beobachtungen schlossen die Autoren, daß das Eintreten der Insulinantwort über qualitative Änderungen des Adenylcyclase-c-AMP-Systems unwahrscheinlich ist. Wie die Untersuchungen mit Theophyllin zeigen, ist bereits zum Zeitpunkt der Geburt das Adenylcyclase-c-AMP-System entwickelt, es scheinen aber quantitative Unterschiede gegenüber erwachsenen Tieren zu bestehen. Lambert et al. (197) stellten bei Untersuchungen zur

Dynamik der Insulinsekretion an foetalen Rattenpankreaskulturen fest, daß diese in Gegenwart von 16,8 mM Glucose nur die erste Phase aufweist, während die gleichzeitige Anwesenheit von 2,5 mM Theophyllin zu einem ähnlichen Sekretionsverlauf führte wie bei Erwachsenen in Gegenwart von Glucose ohne Theophyllin. Die Tatsache, daß die Hemmung der Phosphodiesterase nicht nur zur Insulinsekretion, sondern auch zu einem Insulinprofil führt, das dem von Erwachsenen ähnlich ist, ließ die Autoren vermuten, daß das c-AMP-System sowohl an der Insulinausschüttung als auch an der Reifung des foetalen Insulinsekretionssystems beteiligt ist (197). Die geringere foetale Konzentration an c-AMP im Vergleich zu Erwachsenen kann darauf zurückgeführt werden, daß bei Foeten die Bildung von c-AMP geringer oder daß c-AMP am Angriffsort weniger wirksam ist.
Andererseits wurde aber im c-AMP-Gehalt und in der Phosphodiesteraseaktivität zwischen 21 Tage alten Ratten-Foeten und deren Müttern kein Unterschied festgestellt (198).

Auch die Aminosäuren Leucin (199) und Arginin (118) führen bei 21 Tage alten Foeten und 1-2 bzw. 5 Tage alten Neugeborenen zur Insulinsekretion. Allerdings ist die Insulinsekretion foetaler Inseln bei Inkubation mit 10 mM Arginin und 16,5 mM Glucose nur schwach signifikant erhöht, während bei Inseln von erwachsenen Tieren die Insulinsekretion nach Glucose und Arginin doppelt so hoch ist wie nach Glucose bei Abwesenheit von Arginin.

Im Gegensatz zu Glucose stimulieren Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid an foetalen Pankreaskulturen (200) und Glibenclamid an 21 Tage alten perifundierten Ratteninseln (201) die Insulinsekretion. Der Sekretionsverlauf verläuft unter Glibenclamid in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose biphasisch, wobei die zweite Phase durch Glibenclamid im Vergleich zu Glucose allein deutlich stimuliert ist.
Im Gegensatz dazu stehen Arbeiten von Sodoyez-Goffaux et al. (120). Diese Arbeitsgruppe konnte bei 20 bzw. 21 Tage alten Foeteninseln mit Tolbutamid keine Insulinsekretion beobachten. Die Differenzen können möglicherweise auf der besseren Ansprechbarkeit der foetalen ß-Zelle gegenüber Glibenclamid beruhen.

Alle diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die ß-Zelle des Foeten -obwohl Biosynthese und Speicherung von Insulin bereits erfolgen- nicht wie bei Erwachsenen auf Glucose anspricht, weil sie entweder das Glucosemolekül nicht als Stimulus der Insulinsekretion erkennt und/oder der Glucosemetabolismus noch nicht vollständig entwickelt ist.
Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit wurde in allen Fällen, d.h. bei Inseln von Foeten, neugeborenen und erwachsenen Ratten zwischen 0 und 5,6 mM Glucose keine Änderung des GSH/GSSG-Quotienten beobachtet. Dies bedeutet, daß die im Vergleich zu anderen Organen niedrigeren GSH/GSSG-Quotienten nicht auf einen Glucosemangel während der 15-minütigen Inkubationszeit bzw. während der Präparation

der Inseln zurückgeführt werden können.

Nach den bisherigen Erkenntnissen unseres Labors ist denkbar, daß bei Foeten der Glucosemetabolismus über den PPS noch nicht ausgebildet ist, denn die Glucoseoxidation über den PPS kann bei Foeten mit zunehmender Glucosekonzentration nicht gesteigert werden, nimmt jedoch bei Neugeborenen und Erwachsenen konzentrationsabhängig zu. Entsprechende Befunde wurden bei Bestimmung des NADPH- und NADP-Gehaltes erhalten. Während bei Erwachsenen und Neugeborenen der NADPH/NADP-Quotient in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zunimmt, bleibt er bei foetalen Inseln annähernd konstant (69).

Ähnliche Resultate wurden in dieser Arbeit bei der Untersuchung des GSH- und GSSG-Gehaltes erhalten. Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM führte bei den Inseln erwachsener und neugeborener Tiere zu einer Zunahme von GSH, einer Abnahme von GSSG und einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten. Letzterer lag bei Neugeborenen in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose höher als bei Erwachsenen und bei 16,7 mM etwas niedriger. Der geringere Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten Neugeborener gegenüber dem von Erwachsenen könnte möglicherweise durch eine verminderte Aktivität der Glutathion-Reduktase in dieser Altersstufe erklärt werden.

Bei Foeten erreicht der NADPH/NADP-Quotient bereits in

Gegenwart von 5,6 mM Glucose einen Wert, der dem erwachsener Tiere nach Inkubation mit 16,7 mM entspricht (69). Durch Erhöhung der Glucosekonzentration kann dieser foetale NADPH/NADP-Quotient nicht mehr gesteigert werden. Der GSH/GSSG-Quotient nimmt bei Erhöhung der Glucosekonzentration nur geringfügig zu und liegt bei 16,7 mM Glucose deutlich unter dem Quotienten erwachsener Ratten. Untersuchungen an Erythrozyten von Mäusen haben gezeigt, daß im Alter die Glutathion-Reduktase-Aktivität und der Gehalt an reduziertem Glutathion vermindert sind (202). Vielleicht ist die Aktivität der Glutathion-Reduktase auch im foetalen Alter verringert. Deshalb könnten dann die vermehrt anfallenden Reduktionsäquivalente des NADPH/NADP-Systems nicht auf GSSG übertragen werden.

Was auch immer der Grund dafür sein mag, daß im foetalen Alter der GSH/GSSG-Quotient bei Erhöhung der Glucosekonzentration nicht gesteigert werden kann, so kann doch festgehalten werden, daß diese Unfähigkeit zur Erhöhung des GSH/GSSG-Quotienten eine Ursache für die verminderte Ansprechbarkeit der Insulinsekretion auf einen Glucosereiz hin sein könnte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Zielsetzung

Der intrazelluläre Redoxstatus des GSH/GSSG-Systems wird als wesentlich für die Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose angesehen. Eine Abnahme des Quotienten führt zu einer verminderten Stimulierbarkeit, eine Zunahme, z.B. durch Erhöhung der Glucosekonzentration, zu einer vermehrten Stimulierbarkeit der Insulinsekretion. Der GSH/GSSG-Quotient der Langerhansschen Insel steht in enger Beziehung zu deren PPS-Aktivität sowie zur Höhe des NADPH/NADP-Quotienten. Die Aktivität des PPS und der NADPH/NADP-Quotient sind im foetalen Alter vermindert. PPS-Aktivität und NADPH/NADP-Quotient werden durch exogenes Insulin herabgesetzt. Leucin führt dagegen zu einer Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten.

Wie für andere Organe angenommen wird, besteht zwischen PPS und dem NADPH/NADP-Quotienten einerseits und dem Redoxstatus des GSH/GSSG-Quotienten andererseits ein Zusammenhang. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob in der Langerhansschen Insel

1. die nach Glucosestimulation rasch einsetzende Insulinsekretion mit einem ebenso raschen Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten einhergeht
2. auf den nach Leucin beobachteten Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten eine entsprechende Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten erfolgt
3. exogenes Insulin zu einer Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten führt

4. die Erhöhung der Glucosekonzentration bei Inseln von Foeten und 5 Tage alten Neugeborenen zu einer Erhöhung des GSH/GSSG-Quotienten führt.

6.2. Ergebnisse

1. Nach Inkubationszeiten von 1, 5, 10 und 15 Minuten wurde an Inseln in Gegenwart von 5,6 und 16,7 mM Glucose festgestellt, daß bereits nach einer Minute der GSH-Gehalt zu-, der GSSG-Gehalt abnahm und der GSH/GSSG-Quotient gesteigert wurde. Die GSH/GSSG-Quotienten lagen bei Anwesenheit von 16,7 mM Glucose höher als in Gegenwart von 5,6 mM Glucose.
2. Exogenes Insulin verminderte die durch 5,6 und 16,7 mM Glucose hervorgerufene Zunahme des insulären GSH-Gehaltes. Der GSSG-Gehalt wurde durch exogenes Insulin in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose ebenfalls vermindert, in Gegenwart von 16,7 mM Glucose dagegen erhöht. Exogenes Insulin hatte in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose keinen Einfluß auf den GSH/GSSG-Quotienten. Die durch 16,7 mM Glucose hervorgerufene Erhöhung des GSH/GSSG-Quotienten wurde durch exogenes Insulin verringert.
3. a) 10 mM Leucin führten bei Abwesenheit von Glucose zu keiner Änderung des GSH- und GSSG-Gehaltes und des GSH/GSSG-Quotienten in Langerhansschen Inseln. Auch 5,6 mM Glucose ohne Leucin hatten keinen Einfluß auf den GSH- und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten. Dagegen bewirkten 5,6 mM Glucose und 10 mM Leucin einen Anstieg des GSH- und eine Abnahme des GSSG-

Gehaltes, sowie eine Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten.

b) Die Insulinsekretion wurde nach Inkubation mit 5,6 mM Glucose in Abwesenheit von Leucin nicht verändert, bei Abwesenheit von Glucose durch 10 mM Leucin jedoch erhöht. 10 mM Leucin plus 5,6 mM Glucose führten zu einem weiteren Anstieg der Insulinsekretion.

c) Exogenes Insulin in Konzentrationen von 200 - 800 µE/ml verminderte den durch 5,6 mM Glucose plus 10 mM Leucin erhöhten GSH-Gehalt nicht signifikant, erhöhte jedoch den GSSG-Gehalt und führte daher zu einer Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten.

4. Bei Inseln von erwachsenen und neugeborenen Ratten wurde der GSH-Gehalt mit zunehmender Glucosekonzentration erhöht, der GSSG-Gehalt vermindert und der GSH/GSSG-Quotient gesteigert. Bei Inseln von Foeten war keine signifikante Änderung des GSH- und GSSG-Gehaltes festzustellen, der GSH/GSSG-Quotient wurde nur geringfügig erhöht.

6.3. Schlußfolgerungen

1. Der NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Quotient Langerhansscher Inseln sind bereits eine Minute nach Stimulation mit Glucose erhöht. Die Insulinsekretion setzt ebenfalls innerhalb weniger Minuten ein. Die Befunde dieser Arbeit, bei der es zu einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten 1 Minute nach Zusatz von Glucose kommt, können deshalb als weiterer Anhaltspunkt für die Beteiligung des GSH/GSSG-Systems an der Insulinsekretion angesehen

werden.

2. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß exogenes Insulin die PPS-Aktivität und den NADPH/NADP-Quotienten von Pankreasinseln vermindert. In dieser Arbeit wurde eine Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten durch exogenes Insulin festgestellt. Es ist daher denkbar, daß exogenes Insulin über einen Einfluß auf den Redoxzustand des NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Systems die sekretorische Ansprechbarkeit der ß-Zelle gegenüber Glucose herabsetzt.

3. Leucin führt in Gegenwart von Glucose zu einer Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten in Langerhansschen Inseln. Die durch Leucin hervorgerufene Erhöhung dieses Quotienten bewirkt wiederum eine Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten, der wenigstens teilweise am Mechanismus der leucininduzierten Insulinsekretion beteiligt sein dürfte.

4. Im foetalen Alter spricht der PPS Langerhansscher Inseln noch nicht auf Glucose an. Infolgedessen sind der NADPH/NADP- und, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, der GSH/GSSG-Quotient erniedrigt. Dies dürfte, wenigstens teilweise, die Ursache für die geringe Stimulierbarkeit der Insulinsekretion durch Glucose bei Foeten sein.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Hopkins, F.G.:
Glutathione: A reinvestigation
J. Biol. Chem. 84, 296-320 (1929)

2. Kosower, E.M.:
Chemical properties of glutathione
In: Glutathione: Metabolism and function (eds.:
Arias, I.M. and Jakoby W.B.),
Raven Press, New York, pp. 1-16, (1976)

3. Kosower, N.S., Kosower, E.M.
The glutathione status of cells
Int. Rev. Cytol. 54, 109-160 (1978)

4. Modig, H.G., Edgren, M., Revesz, L.:
Release of thiols from cellular mixed disulphides
and its possible role in radiation protection
Int. J. Rad. Biol. 22, 257-268 (1971)

5. Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
In: Glutathione: Metabolism and function (eds.:
Arias, I.M. and Jakoby, W.B.),
Raven Press, New York, pp. 159-172, (1976)

6. Higashi, T., Tateishi, N., Naruse, A., Sakamoto, Y.:
A novel physiological role of glutathione as a
reservoir of L-cysteine
J. Biochem. 82, 117-124 (1977)

7. Harisch, G., Eikemeyer, J., Schole, J.:
The glutathione status of the rat liver
Experientia 35, 719-720 (1978)

8. Epstein, D.L.:
Introduction to discussion of lens and red cell sulfhydryl membrane groups
Exp. Eye Res. 11, 351-355 (1971)

9. Siliprandi, D., Scutari, G., Zoccarato, F., Siliprandi, N.:
Action of diamide on some energy linked processes of rat liver mitochondria
FEBS Lett. 42, 197-199 (1974)

10. Vignais, P.M., Vignais, P.V.:
Fucsin, an inhibitor of mitochondrial SH-dependent transport-linked functions
Biochim. Biophys. Acta 325, 357-374, (1973)

11. Czech, M.P.:
Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system
J. Biol. Chem. 251, 1164-1170 (1976)

12. Meister, A.:
On the enzymology of amino acid transport
Science 180, 33-39 (1973)

13. Pillion, D.J., Leibach, F.H., von Tersch, F., Mendicino, J.:
Inhibition of protein kinase activity and amino acid and α-methyl-D-glucoside transport by diamide
Biochim. Biophys. Acta 419, 104-111 (1976)

14. Boyland, E., Chasseaud, L.F.:
Glutathione S-Aralkyltransferase
Biochem. J. 115, 985-991 (1969)

15. Morgenstern, R., De Pierre, J.W., Ernstler, L.:
Activation of microsomal glutathione-S-transferase activity by sulfhydryl reagents
Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 657-663 (1979)

16. Watanabe, A., Tabeta, L., Kosaka, K.:
Glutathione-dependent interconversion of micro-heterogenous forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat liver
J. Biochem. 72, 695-701 (1972)

17. Mukherjee, S.P., Lynn, W.S.:
Role of cellular redox state and glutathione in adenylate cyclase activity in rat adipocytes
Biochim. Biophys. Acta 568, 224 - 233 (1979)

18. Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
In: Glutathione (eds.: Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A.)
Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp. 276-287 (1974)

19. Chasseaud, L.F.:
Conjugation with glutathione and mercapturic acid excretion
In: Glutathione: Metabolism and function, (eds: Arias, I.M., Jakoby, W.B.)
Raven Press, New York, pp. 77-114 (1976)

20. Wendel, A., Heinle, H., Silbernagl, S.:
The degradation of glutathione derivatives in the rat kidney
Curr. Prob. Clin. Biochem. 8, 73-84 (1978)

28. Coore, H.G., Randle, P.J.:
Regulation of insulin secretion studies with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro
Biochem. J. 93, 66-78 (1964)

29. Niki, A., Niki, H., Miwa, L., Okunda, J.:
Insulin secretion by anomers of $_D$-Glucose
Science 186, 150-151 (1974)

30. Rossini, A.A., Soeldner, J.S.:
Insulin release is glucose anomeric specific in the human
J. Clin. Invest. 57, 1083-1088 (1976)

31. Ashcroft, S.J.H., Hedeskov, C.J., Randle, P.J.:
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets
Biochem. J, 118, 143-154 (1970)

32. Ashcroft, S.J.H., Weerashinghe, L.C.C., Bassett, J.M., Randle, P.J.:
The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets
Biochem. J. 126, 525-532 (1972)

33. Lazarow, A., Dixit, P.K., Lindall, A., Moran, J., Hostetler, K., Cooperstein, S.J.:
Enzyme specialization in islet tissue
In: The structure and metabolism of the pancreatic islet (eds.: Brolin, S.E., Hellman, B., Kuntson, H.), Pergamon Press, Oxford, pp. 249-268 (1964)

34. Brolin, S.E., Berne, C., Linde, B.:
Measurements of the enzymatic activities required for ATP-formation by glycolysis in the pancreatic islets of hyperglycemic mice (NZO)
Diabetes 16, 21-25 (1967)

35. Pigman, W.:
The carbohydrates Bd. I und II
Academic Press, New York (1970/71)

36. Ashcroft, S.J., Bassett, J.M., Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets
Diabetes 21, 538-545 (1972)

37. Ashcroft, S.J., Weerashinghe, L.C.C., Randle, P.J.:
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release
Biochem. J. 132, 223-231 (1973)

38. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. Täljedal, J.-B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues effects of calcium and sodium on glucose metabolism and insulin release
Biochem. J. 138, 33-45 (1974)

39. Hellerström, C.A.:
Oxygen consumption of the ß-cells in relation to insulin release
In: Structure and metabolism of the pancreatic islets (ed.: Falkmer, S.), p. 315 (1970)

40. Keen, H., Sells, R., Jarrett, R.J.:
A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary resultats
Diabetologia 1, 28-32 (1965)

41. Howell, S.L., Young, D.A., Lacy, P.E.:
Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans
J. Cell Biol. 41, 167-176 (1969)

42. Kilo, C., Devrim, S., Bailey, R., Recant, L.:
Studies in vivo and in vitro of glucose-stimulated insulin release. The effects of metabolizable sugars, tolbutamide, and 2-deoxyglucose
Diabetes 16, 377-385 (1967)

43. Coll-Garcia, E., Gill, J.R.:
Insulin release by isolated pancreatic islets of the mouse incubated in vitro
Diabetologia 5, 61-66 (1969)

44. Webb, J.L.:
Enzyme and metabolic inhibitors
Academic Press, New York (1966)

45. Georg, R.H., Sussman, K.E., Kirsch, W.L.:
Modification of glucose- and tolbutamide-induced insulin release by iodoacetate and Antimycin A
Fed. Proc. Intersoc. 316-321, 249 Abs. (1971)

46. Renold, A.E.:
Insulin biosynthesis and secretion. A still unsettled topic
New Engl. J. Med. 282, 173 (1970)

47. Kanazawa, Y., Orci, L., Lambert, A.E.:
Organ culture of fetal rat pancreas
IV. Effects of metabolic inhibitors on insulin release
Endocrinology 89, 576-583 (1971)

48. Sussman, K.E., Georg, R.H.:
Metabolic control of insulin secretion
Acta Diabet. Lat. 7, 889-908 (1970)

49. Malaisse, W.J., Sener, A., Koser, M., Ravazzola, M., Malaisse-Lagae, F.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release, XXV. Insulin release due to glycogenolysis in glucose-deprived islets
Biochem. J. 164, 447-454 (1977)

50. Heinze, E., Steinke, J.:
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: difference between fetal and adult rats
Endocrinology 88, 1259-1263 (1971)

51. Coper, H., Hadass, H., Lison, H.:
Untersuchungen zum Mechanismus zentral nervöser Funktionsstörungen durch 6-AN
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp.
Pathol. Pharmakol. 255, 97-106 (1966)

52. Herken, H.:
Biosynthesis and action of dinucleotides containing 6-aminonicotinamide on membrane transport processes
Arzneimittelforschung 18, 1235-1245 (1968)

53. Ammon, H.P.T., Steinke, J.:
6-Aminonicotinamide as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in rats
Diabetes 21, 143-148 (1972)

54. Ammon, H.P.T., Steinke, J.:
Effect of 6-AN on insulin release and C_{14} glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Difference between glucose, tolbutamide and aminophylline
Endocrinology 91, 33-38 (1972)

55. Ammon, H.P.T., Orci, L., Steinke, J.:
Effect of chlorpromazine on insulin release in vivo and in vitro in the rat
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 423-429 (1973)

56. Montague, W., Taylor, K.W.:
The role of pentose phosphate pathway in insulin secretion
In: The structure and metabolism of pancreatic islets (eds.: Falkmer, S., Hellman, B., Täljedal, I.-B.)
Pergamon Press, Oxford, pp. 263-274 (1970)

57. Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T.:
Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets: its dependence on glucose concentration
Endocrinology 105, 1269-1274 (1979)

58. Hoppe, E.,:
Einfluß von Leucin und Arginin auf die Sekretion von Insulin sowie den NADPH/NADP-Quotienten und den NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln
Dissertation Tübingen, 1978

59. Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H.:
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released - interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants, and p-chloromercuribenzoate / Diabetes 28, 593-599 (1979)

60. Ammon, H.P.T., Patel, T.N., Steinke, J.:
The role of the pentose phosphate shunt in glucose induced insulin release: in vitro studies with 6-aminonicotinamide, methylene-blue, NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic islets
Biochim. Biophys. Acta 297, 352-367 (1973)

61. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H., Hegner, D.:
Inhibition of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butyl hydroperoxide
Molec. Pharmacology 13, 598-605 (1977)

62. Wagner-Teschner, D.:
Einfluß der Glucosekonzentration auf den NADP- und NADPH-Gehalt sowie die glucose-induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln von gefütterten und hungernden Ratten
Diplomarbeit Fachbereich Chemie-Biochemie
Tübingen, 1977

63. Efendic, S., Cerasi, E., Luft, R., Gladnikoff, G.:
Potentiation of glucose-induced insulin release by glucose in the isolated pancreas of fed and fasted rats
Diabetes 25, 949-954 (1976)

64. Hedeskov, C.J., Capito, K.:
The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets
Biochem J. 140, 423-433 (1974)

65. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Wright, P.H.:
Effect of fasting upon insulin secretion in the rat
Am. J. Physiol. 213, 843-848 (1967)

66. Ammon, H.P.T., Verspohl, E.:
Pyridine nucleotides in panceratic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin
Endocrinology 99, 1469-1476 (1976)

67. Akhtar, M.S., Verspohl, E., Hegner, D., Ammon, H.P.T.:
6-Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin
Diabetes 26, 857-863 (1977)

68. Ammon, H.P.T:
Der Einfluß des Alters auf Glucoseoxidation und Pyridinnukleotide der Langerhans'schen Insel
Akt. Geront. 4, 755-757 (1974)

69. Ammon, H.P.T., Bumiller, G.:
Unveröffentlichte Daten

70. Matschinsky, F.M., Kauffman, F.C., Ellerman, J.E.
Effects of hyperglycaemica on the hexose monophosphate shunt in islets of Langerhans
Diabetes 17, 475-480 (1968)

71. Field, J.B., Johnson, P., Herring, B., Weinberg, A.N.:
Evidence for hexose-monophosphate pathway for glucose metabolism in human pancreatic ß-cells
Nature 185, 468-469 (1960)

72. Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J.:
Effect of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets
Diabetologia 17, 41-44 (1979)

73. Grimm, A.:
Glutathion und Insulinsekretion: Mikromethoden zur Bestimmung reduzierten und oxidierten Glutathions in Langerhansschen Inseln, Beziehungen zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion
Dissertation Tübingen, 1978

74. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Grimm, A., Niklas, H.:
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-96 (1979)

75. Ashcroft, S.J.H., Christie, M.R.:
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans
Biochem. J. 184, 697-700 (1979)

76. Berne, C.:
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-converting enzymes and adenosine triphosphate citrate lyase in some tissues and organs of new zealand obese mice with special reference to the enzyme pattern of the pancreatic islets
J. Histochem. Cytochem. 23, 660-665 (1975)

77. Beutler, E.:
Glutathione reductase / In: Glutathione (eds.: Flohe, L., Benöhr, H.C., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A.)
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

78. Douglas, W.W., Ishida, A., Poisner, A.M.
The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from the isolated neurophypophysis
J. Physiol. 181, 753-759 (1965)

79. Schofield, J.G.:
Effect of sulphydryl reagents on the release of ox growth hormone in vitro
Biochim. Biophys. Acta 252, 516-526 (1971)

80. Hellman, B., Idahl, L.A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B.:
Membrane sulphydryl groups and the pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues
Proc. 8th Congress Intern. Diabet. Feder. Excerpta Medica Amsterdam (1974)

81. Pillion, D.J., Leibach, F.H.:
The effect of diamide and glutathione on the uptake of a-methyl-D-glucoside by slices of rat kidney cortex
Biochim. Biophys. Acta 382, 246-252 (1975)

82. Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B., Correa,W.S.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione of the disulfide
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593-596 (1969)

83. Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J., Kosower, N.S.:
Glutathione
VIII. Difference among substrates by the thiol oxidizing agent, diamide
Biochim. Biophys. Acta 264, 39-44 (1972)

84. Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., Beutler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes-organic hydro-peroxides
Biochem. J. 139, 289-295 (1974)

85. Sies, C., Gerstenecker, C., Menzel, H., Flohé, L.:
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides
FEBS Lett. 27, 171-175 (1972)

86. Eujen, R.:
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin
Dissertation Tübingen, 1979

87. Kosower, E.M., Kosower, N.S., Kanety-Londner, H., Levi, L.:
Glutathione. IX. New thiol-oxidizing agents, DIP, DIP+1 and DIP+2
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 347-351 (1974)

88. Landgraf-Leurs, M.M.C., Mayer, L., Landgraf, R.:
Sulphydryl requirement for insulin release from the perfused pancreas. Studies with ethacrynic acid and dithiothreitol.
Diabetologia 15, 337-342 (1978)

89. Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M.:
Iodoacetate and iodoacetamide-induced alterations of pancreatic α - and ß-cell responses
Endocrinology 97, 698-708 (1975)

90. Bloom, G.D., Hellman,B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin,J., Täljedal,I.-B.:
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic β-cells
Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure
Biochem. J. 129, 241-254 (1972)

91. Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Söderberg,M., Täljedal, I.-B.:
On the possible role of thiol groups in the insulin-releasing action of mercurials, organic disulfides, alkylating agents and sulfonylureas
Endocrinology 99, 1398-1406 (1976)

92. Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu,S., Herchuelz,A., Valverde, I., Sener, A.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release
XXXV. The links between metabolic and cationic events
Diabetologia 16, 331-341 (1979)

93. Panten, U., Christians, J., Kriegstein, E.v., Poser, W., Hasselblatt, A.:
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets
Diabetologia 9, 477-482 (1973)

94. Trus, M.D., Hintz, C.S., Weinstein, J.B., Williams,A.D., Pagliara, A.S., Matschinsky, F.M.:
Effects of glucose and acetylcholine on islet tissue NADH and insulin release
Life Sci 22, 809-816 (1978)

95. Trus, M.D., Hintz, C.S., Weinstein, J.B., Williams, A.D., Pagliara, A.S., Matschinsky, F.M.: A comparison of the effects of glucose and acetylcholine on insulin release and intermediary metabolism in rat pancreatic islets J.Biol. Chem. 254, 3921-3929 (1979)

96. Assal, J.P., Katsilambros, L., Steinke, J.: Insulin feedback inhibition: metabolic changes in incubated rat islets of Langerhans Brief Notes and Comments

97. Service, F.J., Nelson, R.L., Rubenstein, A.H., Go, V.L.W.: Direct effect of insulin on secretion of insulin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide, and gastrin during maintenance of normoglycemia J. Clin. Endocrin. Metabol. 47, 488-493 (1978)

98. Liljenquist, J.E., Chiasson, J.-L., Jennings, A.S., Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H.: Insulin suppression of insulin secretion in man: demonstration by C-peptide assay Diabetes 24, 403 (1975)

99. Rappaport, A.M., Ohira, S., Coddling, J.A., Empey, G., Kalnius, A., Lin, B.J., Haist, R.E.: Effects on insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an in situ isolated portion of the pancreas Endocrinology 91, 168-176 (1972)

100. Iversen, J., Miles, D.W., Arhus, M.D.:
Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas
Diabetes 20, 1-9 (1971)

101. Frerichs, H., Reich, U., Creutzfeldt, W.:
Insulinsekretion in vitro: I. Hemmung der glucose-induzierten Insulinabgabe durch Insulin
Klin. Wschr. 43, 136-141 (1965)

102. Fajans, S.S., Floyd, J.R., J.C., Knopf, R.F., Pek, S. Weissman, P., Conn, J.W.:
Amino acids and insulin release in vivo
Israel J. Med. Sci 8, 233-243 (1972)

103. Floyd, J.R., J.C., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F., Rull, J.:
Stimulation of insulin secretion by amino acids
J.Clin. Invest. 45, 1487-1502 (1966)

104. Milner, R.D.G.:
The mechanism by which leucine and arginine stimulate insulin secretion
Biochim. Biophys. Acta 192, 154-156 (1969)

105. Lambert, A.E., Jenrenaud, B., Junod, A., Renold, A.E.:
Insulin release induced by amino acids
Biochim. Biophys. Acta 174, 540-553 (1969)

106. Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K., Wolff, F.W.:
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas
Diabetes 20, 449-456 (1971)

107. Levin, S.R., Grodsky, G.M., Hagura, R., Smith, D.F., Forsham, P.H.:
Relationship between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas
Endocrinology 90, 624-631 (1972)

108. Malaisse, W., Malaisse-Lagae, F.:
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites
J. Lab. Clin. Med. 72, 438-448 (1968)

109. Panten, U., Christians, J., Kriegstein, E.v., Poser, W., Hasselblatt A.:
Studies on the mechanism of l-leucine- and α-ketoisocaproic adic-induced insulin release from perifused isolated pancreatic islets
Diabetologia 10, 149-154 (1974)

110. Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B.:
Uptake of alanine, arginine and leucine by mammalian pancreatic ß-cells
Endocrinology 89, 1432-1439 (1971)

111. Cooperstein, S.J., Lazarow, A.:
Uptake of amino acids by islets of Langerhans and other tissues of toadfish
Am. J. Physiol. 233, E 19-27 (1977)

112. Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in micro-dissected pancreatic islets
Biochem. J. 123, 513-521 (1971)

113. Panten, U., Kriegstein, E.v., Poser, W., Schönborn,J., Hasselblatt, A.:
Effects of l-leucine and α-ketoisocaproate acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets
FEBS Lett. 20, 225-228 (1972)

114. Christensen, N.H., Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin,J., Tager, H.S., Täljedal, I.-B.:
In vitro stimulation of insulin release by non-metabolizable, transport-specific amino acids
Biochim. Biophys. Acta 241, 341-348 (1971)

115. Gylfe, E., Sehlin, J.:
Interactions between the metabolism of l-leucine and D-glucose in the pancreatic ß-cells
Horm. Metab. Res. 8, 7-11 (1976)

116. Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Carpinelli, A.R., Herchuelz, A., Sener, A.:
The stimulus-secretion coupling of amino-induced insulin release
Metabolism and cationic effects of leucine
Diabetes 29, 431-437 (1980)

117. Händel, M.:
Pentosephosphatshunt Langerhansscher Inseln und Insulinsekretion
Dissertation Tübingen, 1978

118. Heinze, E., Steinke, J.:
Insulin secretion during development: response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats to theophylline and arginine
Horm. Metab. Res. 4, 234-236 (1972)

119. Asplund, K., Westman, S., Hellerström, C.:
Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of fetal and newborn rats
Diabetologia 5, 260-262 (1969)

120. Sodoyez-Goffaux, F., Sodoyez, J.C., Foa, P.P.:
Effects of gestational age, birth and feeding on the insulinogenic response to glucose and tolbutamide by fetal and newborn rat pancreas
Diabetes 20, 586-591 (1971)

121. Hagemann, E.:
Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung
W. de Gruyter Verlag, Berlin (1960)

122. Hanks, J.H., Wallace, E.R.:
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200 (1949)

123. Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P.:
Manometric and biochemical techniques
5th edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis USA

124. Lacy, P.E., Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas
Diabetes 16, 35-39 (1967)

125. Cohn, V.H., Lyle, J.:
A fluorometric assay for glutathione
Anal. Biochem. 14, 434-440 (1966)

126. Hissin, P.J., Hilf, R.:
A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues
Anal. Biochem. 74, 214-226 (1976)

127. Tietze, F.:
Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues
Anal. Biochem. 27, 502-522 (1969)

128. Beutler, E., West, C.:
Comment concerning a fluorometric assay for glutathione
Analyt. Biochem. 81, 458-460 (1977)

129. Havu, N.:
Sulfhydryl inhibitors and pancreatic islet tissue
Acta Endocrinologica 62, 72 (1969)

130. Soeldner, J.S., Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique
Diabetes 14, 771-779 (1965)

131. Heding, L.G.:
Determination of free and antibody-bound insulin in insulin treated diabetic patients
Horm. Metab. Res. 1, 145-146 (1969)

132. Hutton, J.C., Sener, A., Herchuelz, A., Atwater, I., Kawazu, S., Boschero, C., Somers, G., Devis, G., Malaisse, W.J.:
Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose and 2-keto acid-induced insulin release
Endocrinology 106, 203-219 (1980)

133. Matschinsky, F.M., Ellerman, J.E.:
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans
J. Biol. Chem. 243, 2730-2736 (1968)

134. Ashcroft, S.J.H., Capito, K., Hedeskov, C.J.:
Time course studies of glucose-induced changes in glucose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate content of mouse and rat pancreatic islets
Diabetologia 9, 299-302 (1973)

135. Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release, XXXI. Metabolic effects of menadione in isolated islets
Eur. J. Biochem. 87, 121-130 (1978)

136. Sener, A., Hutton, J.C., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release, XXXII. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets
J. Clin. Invest. 62, 868-878 (1978)

137. Grodsky, G.M., Curry, D., Landahl, H., Bennett, L.:
Further studies on the dynamic aspects of insulin release in vitro with evidence for a two-compartmental storage system
Acta Diabet. Lat. 6, 554-579 (1969)

138. Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M.:
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas
Endocrinology 83, 572-584 (1968)

139. Panten, U.:
Biochemical events in pancreatic islets as caused by sulfonylurea derivatives
Proc. 5th Intl. Congr. Pharmacol. San Francisco, 1972

140. Kosower, N.S., Kosower, E.M., Koppel, R.L.:
Sensitivity of hemoglobin thiol groups within red blood cells of rat during oxidation of glutathione
Eur. J. Biochem. 77, 529-534 (1977)

141. Kawazu, S., Boschero, A.C., Delcroix, C., Malaisse,W.J.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release
Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 375, 197-206 (1978)

142. Liljenquist, J.E., Horwitz, D.L., Jennings, A.S., Chiasson, J.-L., Keller, U., Rubenstein, A.H.:
Inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in normal man as demonstrated by C-peptide assay
Diabetes 27, 563-570 (1978)

143. Sodoyez, J.-C., Sodoyez-Goffaux, F., Foa, P.P.:
Feedback regulation of insulin secretion by insulin: role of 3',5'-cyclic AMP
In: The structure and metabolism of the pancreatic islets (eds.: Falkmer, S., Hellman, B., Täljedal, I.B./ Pergamon Press, Oxford, pp 445-450 (1970)

144. Sodoyez, I.-C., Sodoyez-Goffaux, F., Foa, P.P.:
Evidence for an insulin-induced inhibition of insulin release by isolated islets of Langerhans
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 130, 568-571 (1969)

145. Erlandsen, S.L., Wells, L.J., Lazarow, A.:
Effects of beef insulin upon the granulation of beta cells in cultures of pancreases of fetal rats from diabetic mothers
Anat. Rec. 157, 415-424 (1967)

146. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Wrigth, P.H.:
Insulin secretion in vitro by islets from insulin-deficient rats
Proc. Soc. exper. Biol. 126, 474-476 (1967)

147. Loubatières, A., Mariani, M.M., Chapal, J.:
Inhibition de la sécrétion d'insuline par l'élevation de la teneur en insuline du milieu irrignant les cellules beta des ilots de Langerhans du pancreas
C.R. Acad. Sci 266, 2245-2247 (1968)

148. Chu, P.C., Goodner, C.J.:
Lack of functional suppression of pancreatic beta-cells during chronic insulin replacement in the rat
Endocrinology 82, 296-302 (1968)

149. Best, C.H., Haist, R.E.:
The effect of insulin administration on the content of the pancreas
J. Physiol. 100, 142 (1941)

150. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F.:
Chronic effects of insulin and glucagon upon islet function
Diabetologie 5, 349-352 (1969)

151. Ohgawara, H., Tasaka, Y., Kosaka, K., Shizume, K.:
Effect of exogenous bonito insulin on endogenous insulin secretion in dogs
Endocrin. Jap. 21, 147 (1974)

152. Dunbar, J.C., Mc Laughlin, W.J., Walsh, M.-Fj., Foa, P.P.:
Insulin secretion and glucose uptake by isolated islets of the hamster
Effect of insulin, proinsulin and C-peptide
Horm. Metab. Res. 8, 1-6 (1976)

153. Hellman, B., Hellerström, C.:
Histology and histophysiology of the islets of Langerhans in man
In: Handbuch des Diabetes mellitus (ed.: Pfeiffer, E.F.) pp. 89-118, (1968)

154. Hahn, H.J., Michael, R.:
Untersuchungen an Langerhansschen Inseln in vitro
V. Die Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch endogenes Insulin in vitro
Endokrinologie 57, 98-107 (1970)

155. Loreti, L., Dunbar, J.C., Chen, S., Foa, P.P.:
The autoregulation of insulin secretion in the isolated pancreatic islets of lean (obOb) and obese-hyperglycemic (obob) mice
Diabetologia 10, 309-315 (1974)

156. Shima, K., Morishita, S., Sawazaki, N., Tanaka, R., Tarui, S.:
Failure of exogenous insulin to inhibit insulin secretion in man
Horm. Metab. Res. 9, 441-443 (1977)

157. Tanaka, R., Shima, K., Sawazaki, N., Matsuyama, T., Kumahara, Y., Yanaihara, N.:
Failure of exogenous insulin to inhibit C-peptide release from the perfused rat pancreas
Endocrinol. Japon. 27, 343-348 (1980)

158. Sando, H., Kanazawa, Y., Kuzuya, T.,:
Effect of bonito insulin on endogenous insulin secretion in dogs
Americ. J. Physiol. 218, 1357-1362 (1970)

159. Grodsky, G.M.:
Factors influencing different rates of insulin release in vitro
Acta Diabet. Lat. 5, 140-161 (1968)

160. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Lacy, P.E., Wright, P.H.:
Insulin secretion by isolated islets in the presence of glucose, insulin and anti-insulin serum
Proc. Soc. exper. Biol. Med. 124, 497-500 (1967)

161. Ohgawara, H., Suzuki, K., Kosaka, K.:
Effect of prior infusion of exogenous bonito insulin on glucose-induced insulin release in man
Endocrinol. Japon. 20, 307-314 (1973)

162. Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H., Reynolds, C., Molnar, G.D., Yanaihara, N.:
Prolonged suppression of insulin release by insulin-induced hypoglycemia: demonstration by C-peptide assay
Hormon. Metab. Res. 7, 449-452 (1975)

163. Schatz, H., Pfeiffer, E.F.:
Does insulin inhibit its own secretion?
Diabetologia, 12th Annual Meeting of EASD 1976, Abstract 230

164. Beischer, W., Schmid, M., Kerner, W., Keller, L., Pfeiffer, E.F.:
Does insulin play a role in the regulation of its own secretion?
Horm. Metab. Res. 10, 168-169 (1978)

165. Hedeskov, C.J., Capito, K.:
The pentose cycle and insulin release in isolated mouse pancreatic islets during starvation
Biochem. J. 152, 571-576 (1975)

166. Snyder, P.J., Kashet, S., O'Sullivan, J.B.:
Pentose cycle in isolated islets during glucose-stimulated insulin release
Am. J. Physiol. 219, 876-880 (1970)

167. Zawalich, W.S., Karl, R.C., Ferrendelli, J.A., Matschinsky, F.M.:
Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'5'AMP
Diabetologia 11, 231-235 (1975)

168. Bartoli, G.M., Sies, H.:
Reduced and oxidized glutathione efflux from liver
FEBS Lett. 86, 89-91 (1978)

169. Toyota, T., Abe, K., Kudo, M.:
Inhibitory action of rat insulin and synthetic rat C-peptide on insulin secretion in the perfused rat pancreas
Acta Diabet. Lat. 14, 250-256 (1977)

170. Verspohl, E.J., Ammon, H.P.T.:
Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans
J. Clin. Invest. 65, 1230-1237 (1980)

171. Ammon, H.P.T., El Amri, N.:
Unveröffentlichte Daten

172. Hägele, R., Youssif, N., Ammon, H.P.T.:
Effect of thiol oxidants on uptake of lanthan- non-displaceable calcium by isolated rat pancreatic islets
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. 311, Abstract 203, 1980

173. Landgraf, R., Landgraf-Leurs, M.M.C., Hörl, R.:
L-leucine and l-phenylalanine induced insulin release and the influence of D-glucose
Diabetologia 10, 415-420 (1974)

174. Christensen, N.H., Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Tager, H.S., Täljedal, J.B.:
In vitro stimulation of insulin release by non-metabolizable, transport-specific amino acids
Biochim. Biophys. Acta 241, 341-348 (1971)

175. Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, J.B.:
Transport of L-leucine and D-leucine into pancreatic ß-cells with reference to the mechanism of amino acid-induced insulin release
Biochim. Biophys. Acta 266, 436-443 (1972)

176. Goberna, R., Tamarit, Jr.J., Osorio, J., Fussgänger, J., Tamarit, J., Pfeiffer, E.F.:
Action of ß-hydroxybutyrate, acetoacetate and palmitate on the insulin release in the perfused isolated rat pancreas
Horm. Metab. Res. 6, 256-260 (1974)

177. Malaisse-Lagae, F., Brisson, G.R., Malaisse, W.J.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release, VI. Analogy between the insulinotropic mechanism of sugars and amino acids
Horm. Metab. Res. 3, 374-378 (1971)

178. Gylfe, E.:
Glucose oxidation and contents of free amino acids in pancreatic ß-cells stimulated by a non-metabolizable leucin analogue
Biochim. Biophys. Acta 343, 584-589 (1974)

179. Montague, W., Taylor, K.W.:
Islet-cell metabolism during insulin release: effects of glucose, octanoate, tolbutamide, glucagon and theophylline
Biochem. J. 115, 257-262 (1969)

180. Amm, U.:
Einfluß von Alter, Leucin und ∝-Ketoisocapronat auf Glucoseoxidation und Pentosephosphatshunt-Aktivität Langerhansscher Inseln der Ratte
Dissertation Tübingen 1981

181. Mac Donald, M.J., Ammon, H.P.T., Patel, T., Steinke,J.:
Failure of 6-aminonicotinamide to inhibit the potentiating effect of leucine and arginine on glucose-induced release in vitro
Diabetologia 10, 761-765 (1974)

182. Gylfe, E.:
Comparison of the effect of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase
Acta Diabet. Lat. 13, 20-24 (1976)

183. Panten, U., Christians, J.:
Effects of 2-endo-amino-norbornane-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyridine nucleotides of isolated perifused pancreatic islets
Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 276, 55-62 (1973)

184. Agren, A., Andersson, A., Hellerström, C.:
Effects of D-glyceraldehyde and D-glucose on the insulin release of pancreatic islets isolated from the newborn rat
FEBS Lett. 71, 185-188 (1976)

185. Andersson, A., Grill, V., Asplund, K., Berne, C., Agren, A., Hellerström, C.:
Functional maturation of the pancreatic ß-cell
In: Early diabetes in early life (eds.: Camerini-Davalos, R., Cole, H.S.)
Academic Press, New York, pp. 49-56 (1975)

186. Agren, A., Brolin, S.E. Hellerström, C.:
Glucose phosphorylation and insulin release of the pancreatic islets from newborn rats
Diabetologia 11, 329 (1975)

187. Asplund, K., Hellerström, C.:
Glucose metabolism of pancreatic islets isolated from neonatal rats
Horm. Metab. Res. 4, 159-163 (1972)

188. Düppenbecker, H.:
Einfluß der Glucosekonzentration auf die Glucoseutilisation, die Glucoseoxidation, sowie die Pentosephosphatshunt-Aktivität bei Langerhansschen Inseln von foetalen, neugeborenen und trächtigen Ratten
Dissertation Tübingen 1981

189. Asplund, K.:
Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas
Europ. J. Clin. Invest. 3, 338-344 (1973)

190. Burr, J.M., Kanazawa, Y., Marliss, E.B., Lambert, A.E.:
Biphasic insulin release from perifused cultured fetal rat pancreas. Effects of glucose, pyruvate and theophylline
Diabetes 20, 592-597 (1971)

191. Kervran, A., Randon, J.:
Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro. Effects of glucose, pyruvate and theophylline
Diabetes 29, 673-678 (1980)

192. Freie, H.M.P., Pasma, A., Bonman, P.R.:
Quantitative analysis of pancreatic islet development and insulin storage in the foetal and newborn rat
Acta Endocrinol. 80, 657-666 (1975)

193. Asplund, K., Andersson, A., Jarronsse, C., Hellerström,C.:
Fetomaternal unit in diabetes. Clinical and experimental aspects. Function of the fetal endocrine pancreas
Israel J. Med. Sci. 11, 581-590 (1975)

194. Asplund, K.:
Effects of glucose on insulin biosynthesis in foetal and newborn rats
Horm. Metab. Res. 5, 410 (1973)

195. Heinze, E., Schatz, H., Nierle, C., Pfeiffer, E.F.:
Insulin biosynthesis in isolated pancreatic islets of fetal and newborn rats
Diabetes 24, 373-377 (1975)

196. Taniguchi, H., Hasegwa, M., Kobayashi, T., Watanabe, Y., Seki, M., Murakami, K., Baba, S.:
Restoration by adenosine and theophylline of glucose-induced insulin responsiveness in newborn rats
Horm. Metab. Res. 9, 257-260 (1977)

197. Lambert, E., Kanazawa, Y., Burr, J.M., Orci, L., Renold, A.E.:
On the role of cyclic AMP in insulin release:
I. Overall effects in cultured fetal rat pancreas
Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 232-244 (1971)

198. Mintz, D.H., Levey, G.S., Schenk, A.:
Adenosine 3'5'cyclic monophosphate and phosphodiesterase activities in isolated fetal and neonatal rat pancreatic islets
Endocrinology 92, 614-617 (1973)

199. Sodoyez-Goffaux, F., Sodoyez, J.C., De Vos, Cl.J., Foa, P.P.:
Insulin and glucagon secretion by islets isolated from fetal and neonatal rats
Diabetologia 16, 121-123 (1979)

200. Lambert, A.E., Jeanrenaud, B., Junod, A., Renold,A.E.:
Organ culture of fetal rat pancreas, II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents
Biochim. Biophys. Acta 174, 540-553 (1969)

201. Heinze, E., Beischer, W., Osorio, J., Pfeiffer, E.F.:
Insulin secretion in the perinatal period of the rat
In vivo and in vitro effects of glucose and glibenclamide (HB 419)
Diabetologia 11, 313-320 (1975)

202. Abraham, E.C., Taylor, J.F., Lang, C.A.:
Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism
Biochem. J. 174, 819-825 (1978)

Lebenslauf

Am 8. September 1952 wurde ich, Susanne Lutz, als Tochter des Albert Lutz, Prokurist und seiner Ehefrau Hilde, geb. Möck, in Öhringen (Hohenlohekreis) geboren.

Von Frühjahr 1959 bis Frühjahr 1963 besuchte ich die Volksschule in Öhringen, wechselte anschließend zum Hohenlohe-Gymnasium Öhringen, wo ich im Juni 1971 die Reifeprüfung erlangte.

Meine Ausbildung als Apothekerpraktikantin, die ich am 28. Juni 1973 mit dem pharmazeutischen Vorexamen abschloß, erhielt ich in der Bahnhof-Apotheke Öhringen.
Anschließend war ich bis zum Beginn meines Studiums in der Hirsch-Apotheke in Öhringen als Apotheker-Assistentin tätig.

Im April 1975 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen auf und legte dort am 4. April 1977 den ersten Teil, und am 11. September 1978 den zweiten Teil der pharmazeutischen Prüfung ab. Die Approbation als Apothekerin wurde mir am 27. September 1978 erteilt.
Im November 1978 begann ich an der Universität Tübingen bei Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im April 1981 beendete.
Seit Januar 1979 bin ich, bis zum heutigen Tag, als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren

H. Auterhoff und K.-A. Kovar (Pharm. Chemie), E. Graf (Pharm. Technologie), E. Reinhard (Pharm. Biologie), J. Schultz (Biochemie), E. Lindner (Anorg. Chemie), E. Bayer (Org. Chemie), R.E. Bader (Medizinische Mikrobiologie), H. Seiler (Physik)

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321